

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA



\* 5 3 0 9 5 5 9 4 2 8 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**TRATAMIENTOS NEONATALES Y DESARROLLO  
DEL SISTEMA OPIOIDE: ALTERACIONES  
NEUROENDOCRINAS Y COMPORTAMENTALES  
ASOCIADAS**

Tesis Doctoral presentada por

D. CARLOS DE CABO DE LA VEGA

Vº . Bº Directora

Dra. Mª PAZ VIVEROS HERNANDO

Madrid, 30 de Mayo 1993

***A mi familia***

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal) de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de la Dra. M<sup>a</sup> Paz Viveros Hernando.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo y cordial agradecimiento a la Dra. M<sup>a</sup> Paz Viveros Hernando por su eficaz y siempre entusiasta labor de dirección de la presente Tesis Doctoral, así como por su continua disponibilidad, dedicación y ayuda.

Quisiera agradecer al Dr. Rafael Hernández el haberme iniciado en el campo de la Neurofisiología y su decidido apoyo para comenzar y llevar a cabo mi investigación sobre este campo en el Departamento.

Desearía mostrar mi gratitud sincera al Dr. Ian Kitchen de la Universidad de Surrey por haber aceptado que se realizaran en su laboratorio los experimentos de unión de ligando a receptor y sobre nocicepción, así como por su supervisión de mi trabajo en Surrey. También mi más cordial reconocimiento para Mary Kelly por haberme enseñado las técnicas que precisé emplear en dicha institución y su eficacísima y amable asistencia en todo momento.

Mi agradecimiento también a las Dras. M<sup>a</sup> Isabel Martín y M<sup>a</sup> Isabel Colado del Departamento de Farmacología (Facultad de Medicina) sin cuya colaboración hubiera sido imposible la valoración de las monoaminas encefálicas, junto con mi gratitud por su valioso asesoramiento sobre estos temas.

A la Dra. Rosa M<sup>a</sup> Arahuetes debo agradecer su generosa y desinteresada cooperación en la estimación de los parámetros cerebelares, poniendo siempre a mi disposición el material e información necesarios para mi experimentación y aconsejándome en todo momento. Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento a Yolanda Diebold por su inestimable asistencia en la puesta a punto de estas técnicas.

Mi gratitud a las Dras. M<sup>a</sup> Luisa Leret y M<sup>a</sup> Isabel González por su orientación sobre la utilización de las pruebas comportamentales de tablero de agujeros y laberinto en cruz, así como sobre cuestiones de desarrollo y diferencias sexuales en los sistemas monoaminérgicos.

Al Dr Julio Alonso (Departamento de Biomatemática) agradezco su amable y utilísimo asesoramiento sobre cuestiones estadísticas.

Asimismo, mi agradecimiento a las Dras. Mercedes Alonso y Mónica de la Fuente, directoras del Departamento de Biología Animal II durante la realización de esta Tesis, por haberme permitido llevar a cabo este trabajo en dicha institución, dándome todo tipo de facilidades.



No podría olvidar la ayuda insustituible de mi infatigable *compa* de laboratorio Andrés Pujol, cuya compañía fue además un gran estímulo y apoyo en los momentos más duros del trabajo (a pesar de que nunca haya valorado adecuadamente mis cualidades para el *mando* y el *Cante hondo*).

También quiero agradecer muy especialmente a M<sup>a</sup> Clara Sañudo su ayuda, preocupación y solidaridad durante mis comienzos en el Departamento y siempre; a M<sup>a</sup> del Mar Sánchez sus *consejos morfológicos*; a Juan José Garrido su *solícito* aporte de separatas; a Ricardo Madrid su *amistad invisible*; a M<sup>a</sup> del Mar González su contribución a mantener mis niveles de azúcar en sangre; y a Elena Sánchez y M<sup>a</sup> José González el haberse *proclamado* mis *vecinas favoritas*.

Deseo, asimismo, dar las gracias a mis compañeros de la *School of Biological Sciences* de la Universidad de Surrey -Andrea Dunphy, Julie Peachey, Julia Nicholls, Tracy Crook, Alison (Trudy) Kennedy, Lara Blann, Bala Muhammed, Colin Brown, Mark Bolton, David Hall, Steven Bailey, Gareth Shackleton, Abraham Iyambo, Nana Yeboah y Peitan Liu- por su extraordinaria acogida. Además deseo agradecer a mi *colega* de laboratorio Dean Hickman su valiosa asistencia en el manejo de materiales radiactivos, así como en los terribles *dúos* y *corridos de toros* realizados durante las largas incubaciones, para gran horror del personal, investigador y académico.

Debo *eterno* agradecimiento a Javier Casado [Dr.] (Depto. Bioquímica, F. Biología, UCB), compañero de *exilio* en la Universidad de Surrey, por haberme *guiado y protegido* en mi primera llegada a Guildford, completamente *pardillo*, y haber sufrido pacientemente mis *depres* tras mis interminables jornadas de *maratón de binding* en el *labbo*.

Tengo también una entrañable deuda de gratitud con Alexandra Salewski por prestar atención a mis aburridas disgresiones sobre *Psiconeuroendocrinología* (!?) en la cocina del viejo Wey 3 y haber seguido animándome desde entonces con tanto interés y cariño.

A Myriam, Amadeo y Guille es necesario agradecerles la ilusión y entusiasmo con que en todo momento han seguido mis aventuras y desventuras *científicas*, y el gran favor de permitirme utilizar las instalaciones de ROSTAND para imprimir esta Tesis. Y a mi hermano Antonio (auténtico *todoterreno*) su continua ayuda en los diversas *situaciones límite* habidas durante estos años, y en especial su asistencia con los ordenadores e impresoras (incluyendo la presente).

Esta Tesis ha contado con una Beca Predoctoral Complutense y ha recibido financiación de la CICYT (PB86-0603) y del *British Council*. La  $\beta$ -funaltrexamina utilizada en este trabajo fue donada generosamente por el Dr. P. Birch (GLAXO, Reino Unido).

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.- ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN . . . . .	1
I.1. Sistema opioide endógeno . . . . .	1
I.1.1 Generalidades . . . . .	1
I.1.1.1 Reseña histórica . . . . .	1
I.1.1.2 Familias de péptidos opioides . . . . .	2
I.1.1.3 Receptores opioides . . . . .	10
I.1.1.4 Ligandos sintéticos . . . . .	15
I.1.1.5 Funciones del sistema opioide . . . . .	18
I.1.2 Desarrollo . . . . .	18
I.1.2.1 Desarrollo de los péptidos opioides . . . . .	19
I.1.2.2 Desarrollo de los receptores opioides . . . . .	20
I.1.3 Plasticidad . . . . .	22
I.1.4 Sistema opioide y nocicepción . . . . .	26
I.1.4.1 Modulación del dolor por el sistema opioide . . . . .	26
I.1.4.2 Mecanismos no opioidérgicos . . . . .	32
I.1.4.3 Pruebas nociceptivas . . . . .	35
I.2 Interacciones sistema opioide-monoaminas . . . . .	39
I.3 Sistema opioide y comportamiento . . . . .	45
I.4 Papel del sistema opioide en el desarrollo neurobiológico y somático . . . .	51
II. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL . . . . .	54
III. MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .	58
III.1 Animales y condiciones experimentales . . . . .	58
III.2 Valoración de los receptores y nocicepción . . . . .	61

III.2.1 Efectos del aislamiento sexual en el desarrollo . . . . .	61
III.2.1.1 Aislamiento sexual . . . . .	61
III.2.1.2 Valoración de los receptores $\mu$ : ensayos de unión de ligando a receptor <i>in vitro</i> . . . . .	62
III.2.1.3 Determinación de proteínas en el homogenado . . . . .	64
III.2.1.4 Pruebas nociceptivas . . . . .	66
III.2.1.5 Grupos experimentales . . . . .	69
III.2.2 Efectos del aislamiento sexual y la $\beta$ -FNA . . . . .	70
III.2.2.1 Aislamiento sexual y tratamiento farmacológico . . . . .	70
III.2.2.2 Valoración de los receptores $\mu$ : ensayos de unión de ligando a receptor <i>in vitro</i> . . . . .	71
III.2.2.3 Determinación de proteínas en el homogenado . . . . .	72
III.2.2.4 Pruebas nociceptivas . . . . .	72
III.2.2.5 Grupos experimentales . . . . .	73
III.3 Interacciones SOE-sistemas monoaminérgicos . . . . .	77
III.3.1 Tratamiento con naltrexona . . . . .	77
III.3.2 Disección de las regiones encefálicas . . . . .	78
III.3.3 Valoración de las aminas biógenas por HPLC . . . . .	79
III.3.4 Grupos experimentales . . . . .	81
III.4 Estudios comportamentales . . . . .	84
III.4.1 Tratamiento con naltrexona . . . . .	84
III.4.2 Aparatos . . . . .	84
III.4.2.1 Tablero de agujeros . . . . .	85
III.4.2.2 Campo abierto . . . . .	85
III.4.2.3 Laberinto en cruz . . . . .	86

III.4.3 Técnicas experimentales . . . . .	90
III.4.3.1 Tablero de agujeros . . . . .	91
III.4.3.2 Campo abierto . . . . .	94
III.4.3.3 Laberinto en cruz . . . . .	96
III.4.4 Grupos experimentales . . . . .	98
III.5. Seguimiento se parámetros relacionados con el desarrollo neurobiológico y somático . . . . .	100
III.5.1 Estimación del ADN, proteínas y peso del cerebelo, número de núcleos y razón contenido de proteínas por núcleo . . . . .	100
III.5.1.1 Determinación de la concentración de ADN . . . . .	101
III.5.1.2 Determinación de la concentración de proteínas . . . . .	103
III.5.1.3 Cálculo del número de núcleos y de la razón contenido de proteínas por núcleo . . . . .	104
III.5.2 Aparición de la apertura ocular bilateral . . . . .	106
III.5.3 Consumo alimentario y de bebida . . . . .	106
III.5.4 Evolución ponderal . . . . .	107
III.6 Análisis estadístico . . . . .	108
III.6.1 Valoración de receptores $\mu$ proteínas y nocicepción . . . . .	108
III.6.1.1 Efectos del aislamiento sexual en el desarrollo . . . . .	108
III.6.1.2 Efectos del aislamiento sexual y la $\beta$ -FNA . . . . .	109
III.6.2 Interacciones SOE-sistemas monoaminérgicos . . . . .	110
III.6.3 Estudios comportamentales . . . . .	111
III.6.4 Seguimiento de parámetros relacionados con el desarrollo neurobiológico y somático . . . . .	113

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	115
IV.1 Valoración de receptores $\mu$ y nocicepción .....	115
IV.1.1 Aislamiento sexual .....	115
IV.1.1.1 Efectos sobre el desarrollo del receptor $\mu$ y contenido de proteínas .....	115
IV.1.1.2 Efectos sobre las respuestas nociceptivas .....	119
IV.1.1.3 Gráficas y tablas .....	123
IV.1.1.4 Discusión .....	127
IV.1.2 Aislamiento sexual y $\beta$ -FNA .....	135
IV.1.2.1 Efectos sobre el receptor $\mu$ y contenido de proteínas ..	135
IV.1.2.2 Efectos sobre las respuestas nociceptivas .....	139
IV.1.2.3 Gráficas y tablas .....	142
IV.1.2.4 Discusión .....	150
IV.2 Interacciones SOE-sistemas monoaminérgicos: tratamiento con naltrexona	162
IV.2.1 Efectos a los 7 días de edad .....	162
IV.2.2 Efectos a los 14 días de edad .....	163
IV.2.3 Efectos a los 22 días de edad .....	168
IV.2.4 Efectos en la edad adulta .....	170
IV.2.5 Perfil de desarrollo de las variables estudiadas .....	171
IV.2.6 Tablas y gráficas .....	180
IV.2.7 Discusión .....	200
IV.4 Estudios comportamentales: tratamiento con naltrexona .....	216
IV.3.1 Tablero de agujeros .....	216
IV.3.2 Campo abierto .....	219
IV.3.2.1 Primer día de prueba .....	220

IV.3.2.2 Parámetros que no variaron con	
la repetición de la prueba . . . . .	221
IV.3.2.3 Efectos de la repetición de la prueba . . . . .	222
IV.3.3 Laberinto en cruz . . . . .	228
IV.3.4 Tablas y gráficas . . . . .	231
IV.3.5 Discusión . . . . .	246
 IV.4 Seguimiento de parámetros relacionados con el desarrollo	
neurobiológico y somático: tratamiento con naltrexona . . . . .	272
IV.4.1 ADN, proteínas y peso del cerebelo; número de núcleos	
y razón contenido de proteínas por núcleo . . . . .	272
IV.4.2 Apertura ocular bilateral . . . . .	277
IV.4.3 Consumo alimentario y de bebida . . . . .	277
IV.4.4 Evolución ponderal . . . . .	278
IV.4.5 Tablas y gráficas . . . . .	281
IV.4.6 Discusión . . . . .	289
 V. DISCUSIÓN GENERAL . . . . .	300
 VI. CONCLUSIONES . . . . .	313
 VII. BIBLIOGRAFÍA . . . . .	316

## **I. INTRODUCCIÓN.-ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN**

## I.1 SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO

### I.1.1 GENERALIDADES

#### I.1.1.1 Reseña histórica

A pesar de que su descubrimiento puede considerarse como reciente, los péptidos opioides endógenos son uno de los grupos de neuropéptidos a los que se ha dedicado un estudio más extenso. Puede considerarse el bienio 1969-1971 como fundamental en las primeras aproximaciones sobre este campo. En un primer estadio de estas investigaciones, se observó que la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal en la rata producía analgesia (Reinolds 1969). Más tarde, y en esta misma línea, Mayer y colaboradores (1971) y Akil y colaboradores (1976) descubrieron que la naloxona - antagonista opiáceo de amplio espectro- antagonizaba, al menos parcialmente, la analgesia inducida por estimulación. Por otra parte, en una aproximación de carácter bioquímico, Goldstein y colaboradores en 1971 establecieron los criterios para la distinción entre unión opiácea específica e inespecífica en tejido encefálico. El siguiente avance tuvo lugar en 1973 cuando tres grupos independientemente informaron de la existencia de unión opiácea estereoespecífica, la cual comenzó a denominarse como *receptor opiáceo* (Pert y Snyder 1973; Simon y col. 1973; Terenius 1973).

Dado que había sitios específicos de unión en el encéfalo, parecía lógico postular



la existencia de un ligando endógeno en el sistema nervioso central. En 1975 varios grupos demostraron que el encéfalo y los extractos de hipófisis presentaban actividad de tipo opiáceo (Cox y col. 1975; Hughes 1975; Pasternak y col. 1975; Terenius y Wahlström 1975). A partir de estos hallazgos, y en una rápida sucesión de descubrimientos, se identificaron las metionina- y leucina-encefalinas (Hughes y col. 1975), así como la actividad opioide del fragmento 61-69 de la  $\beta$ -lipotropina: la  $\beta$ -endorphina (Adler 1980; Bradbury y col. 1976; Li y Chung 1976).

Posteriormente se ha podido ir comprobando la existencia de tres familias de péptidos endógenos de tipo opiáceo y múltiples tipos de receptores, los cuales reciben ya la denominación *opioide* y juntos constituyen el sistema opioide endógeno (SOE).

#### I.1.1.2 Familias de péptidos opioides

Los péptidos opioides endógenos son sintetizados a partir de moléculas de mayor tamaño, existiendo varios precursores diferentes (para revisión ver Bicknell 1985). Este hecho nos permite agruparlos en *familias de péptidos* derivados de tres moléculas precursoras diferentes que corresponden a tres genes distintos, posiblemente originados a partir de un mecanismo evolutivo común (Herbert y col. 1985). Dichas moléculas son la proopiomelanocortina, proencefalina (o proencefalina A) y prodinorfina (o proencefalina B) y su tamaño oscila entre los 256-265 aminoácidos. Los péptidos son localizados y extraídos de cada uno de estos precursores fragmentando por zonas flanqueadas por dos

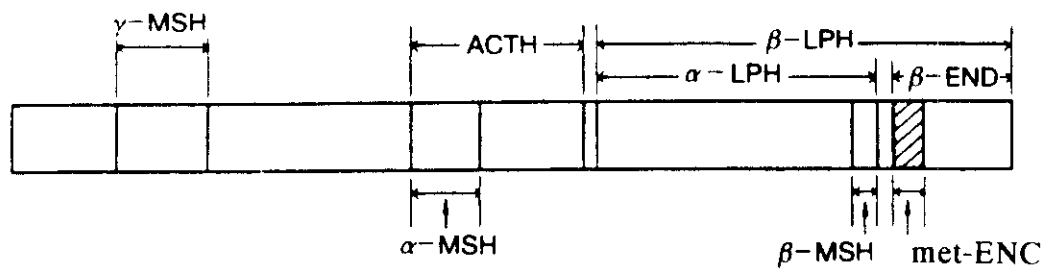
aminoácidos básicos (Lys-Arg). [Este procesamiento se esquematiza en la Fig. 1 y en la Tabla 1 se muestran las estructuras de los péptidos opioides derivados más importantes].

La proopiomelanocortina (POMC) contiene las secuencias para la hormona estimulante de los melanocitos  $\gamma$  ( $\gamma$ -MSH); la adrenocorticotropina (ACTH) -que contiene las secuencias para la  $\alpha$ -MSH y el péptido CLIP- y la  $\beta$ -lipotropina ( $\beta$ -LPH). Esta última contiene las secuencias de la  $\beta$ -MSH y las distintas endorfinas:  $\beta$ -endorfina ( $\beta$ -END) 1-31,  $\beta$ -END 1-27,  $\beta$ -END 1-26,  $\gamma$ -END 1-17 y  $\alpha$ -END. Las más importantes son las  $\beta$ -END 1-31 y  $\beta$ -END 1-27 y, aunque todas contienen una molécula de metionina encefalina (ver más adelante), ésta nunca se libera a partir de aquellas. Dependiendo del tejido de que se trate, existen importantes diferencias en cuanto al procesamiento, modificaciones post-traducción y almacenamiento. En el lóbulo anterior de la hipófisis la ACTH predomina sobre la  $\alpha$ -MSH; la  $\beta$ -LPH (que no tiene actividad opioide) y la  $\beta$ -END están presentes en cantidades aproximadamente equimolares. En el lóbulo intermedio, sin embargo, la ACTH y la  $\beta$ -LPH son casi totalmente procesadas hasta  $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -END. Además en el lóbulo intermedio la  $\beta$ -endorfina sufre modificaciones post-traducción para dar lugar a formas N-acetiladas (N-acetil  $\beta$ -endorfina) y C-truncadas ( $\alpha$ - y  $\gamma$ -endorfinas). La  $\beta$ -END no aparece en el lóbulo posterior (para revisión ver por ejemplo Bradford 1988; Cooper y col. 1986; Ganong 1989; Dores y col. 1988; Höllt 1991; McDowell y Kitchen 1987; Millan y col. 1991; Zakarian y Smyth 1982).

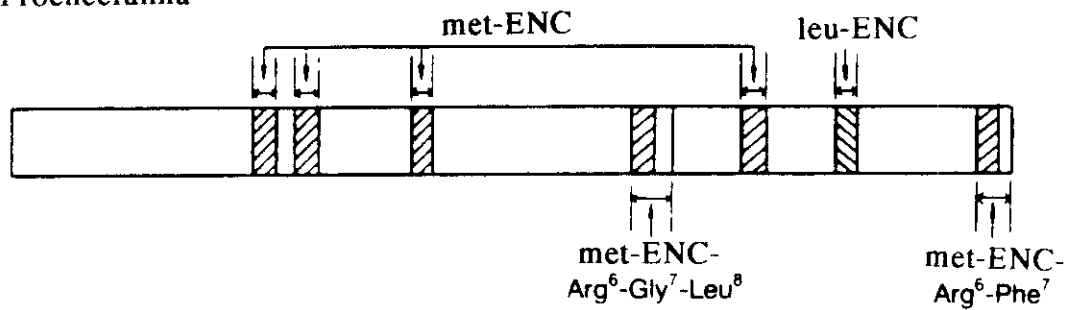
En el encéfalo, las células que sintetizan  $\beta$ -END están confinadas principalmente

## MOLÉCULAS PRECURSORAS

### Pro-opiomelanocortina



### Proencefalina



### Prodinorfina

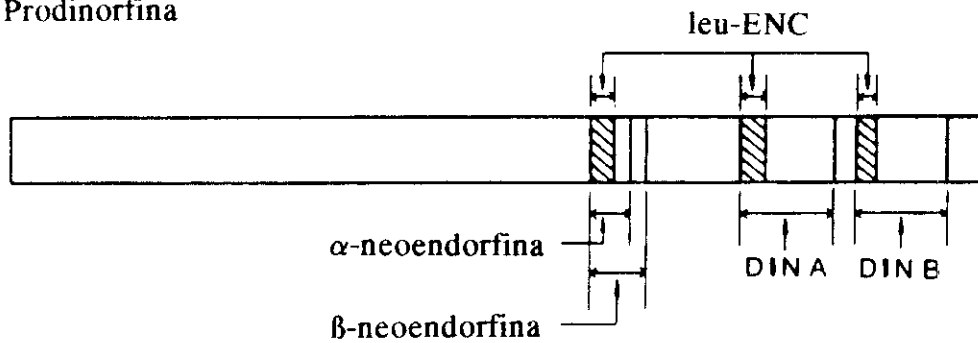


FIG. 1. Representación esquemática de las tres principales moléculas precursoras de los péptidos opioides (pro-opiomelanocortina, proencefalina y prodinorfina) indicando los productos resultado del procesamiento de cada precursor (adaptado a partir de Akil y col. 1984, según aparece en Dyer y Bicknell 1989)

Tabla 1. PÉPTIDOS OPIOIDES MÁS REPRESENTATIVOS Y SUS PRECURSORES\*

Precursor	Péptidos opioides	Estructuras
POMC	$\beta$ -endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln <sub>31</sub>
	$\alpha$ -endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr <sub>16</sub>
PENC	Met-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met <sub>5</sub>
	Leu-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu <sub>5</sub>
	Heptapéptido	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe <sub>7</sub>
	Octapéptido	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Gly-Leu <sub>8</sub>
PDIN	Dinorfina 1-8	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile <sub>8</sub>
	Dinorfina 1-17	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-lys-Trp-Asp-Asn-Gln <sub>17</sub>
	$\alpha$ -neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys <sub>10</sub>
	$\beta$ -neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro <sub>9</sub>
PDER	Dermorfina	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser <sub>7</sub>
	Deltorfina	Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp <sub>7</sub>
	[D-Ala <sup>2</sup> ]deltorfina I/II	Tyr-D-Ala-Phe-[Asp/Glu]-Val-Val-Gly <sub>7</sub>

\*Elaborado a partir de Bradford 1988, Ganong 1989, McKnight y Rees 1991, Millan y colaboradores 1991, y Snyder 1977.

en el núcleo arqueado del hipotálamo. Estas estructuras inervan otros núcleos hipotalámicos y extrahipotalámicos (en la formación reticular, locus coeruleus, amígdala medial, tálamo periventricular, núcleo accumbens y septum ventral) y también la eminencia media (para revisión ver Ganong 1989). El procesamiento en cerebro es similar al que tiene lugar en el lóbulo intermedio, con un predominio marcado de la  $\beta$ -END y la  $\alpha$ -MSH sobre la  $\beta$ -LPH y la ACTH (Civelli y col. 1984; Höllt 1986; Watson y col. 1984).

La molécula de proencefalina (PENC) contiene las secuencias para cuatro moléculas de metionina-encefalina (met-encefalina) y una de leucina-encefalina (leu-encefalina), el segmento *syn-enk* (que no contiene secuencias opioides), heptapéptido (met-encefalina-arg-phe), octapéptido (met-encefalina-arg-gly-leu (MERGL)), pudiendo generarse dos péptidos intermedios E y F. El péptido F contiene dos moléculas de met-encefalina y sólo es activo sobre los receptores  $\epsilon$ . El péptido E incluye una molécula de met-encefalina y otra de leu-encefalina y posee gran afinidad por los sitios de unión  $\mu$  y  $\kappa$ . La met-encefalina y leu-encefalina parecen estar presentes en los tres lóbulos hipofisarios. Las neuronas encefalinérgicas se encuentran ampliamente distribuidas por el encéfalo, tanto en núcleos hipotalámicos como extrahipotalámicos (núcleo V del tracto espinal, núcleos del rafe, núcleos parabraquial y vestibular medial, sustancia gris periacueductal, sustancia nigra, amígdala, estriado, núcleo intersticial de la estría terminal y septum lateral) (para revisión ver Ganong 1989, Goodman y col. 1980). La región externa de la eminencia media es especialmente rica en inervación encefalinérgica proveniente de múltiples orígenes, entre los que se encuentran los núcleos paraventricular y arqueado del hipotálamo (Höllt 1986;

Udenfriend y Kilpatrick 1984; Watson y col. 1984).

En la molécula de prodinorfina (PDIN) están contenidas las secuencias para leu-enkefalina, dinorfina A (1-17) que a su vez puede ser degradada a dinorfina (1-8), dinorfina B (1-13) y a  $\alpha$ - y  $\beta$ -neoendorfinas. Las proporciones relativas de los diversos péptidos varían dependiendo del tejido. En el lóbulo anterior de la hipófisis, análogamente a lo que ocurre con la POMC, el procesamiento termina prematuramente dando lugar sólo a los péptidos de mayor peso molecular. Es escaso el contenido de péptidos relacionados con la dinorfina en el lóbulo intermedio. En cambio, son abundantes en el lóbulo posterior. En el encéfalo, los péptidos relacionados con la dinorfina se encuentran en numerosos núcleos hipotalámicos, sistema límbico y mesencéfalo. Además existe una ruta dinorfinérgica que se proyecta desde el núcleo paraventricular a la eminencia media externa y lóbulo posterior de la hipófisis (Goldstein 1984; Höllt 1986; Watson y col. 1984).

Respecto a la localización de los péptidos cabe añadir que además de en el encéfalo los péptidos derivados de la proencefalina y la prodinorfina son sintetizados también en la médula espinal, y que se ha detectado la presencia de los tres precursores y algunos de sus derivados en la médula adrenal y otros tejidos periféricos tales como el hígado, ovario, testículo, bazo, células inmunitarias, pulmón, tiroides, colon y duodeno (para revisión ver Höllt 1991).

Al igual que sucede con otras familias de neuropéptidos del sistema nervioso de los

Mamíferos que tienen su correlato en tejidos y órganos de Peces y Anfibios, se han encontrado opioides en la piel de las ranas del género *Phyllomedusa* (Tabla 1). De el mismo modo que en los Mamíferos, estos péptidos también proceden de la ruptura proteolítica de precursores de mayor tamaño (pro-dermorfinas, PDER), sin embargo su procesamiento post-traducción incluye la inusual conversión de un L-aminoácido (alanina o metionina) a su isómero D. Los primeros péptidos de este tipo se encontraron en *Phyllomedusa sauvagei* y fueron la dermorfina y la deltorfina, que presentan gran afinidad y selectividad para los receptores  $\mu$  y  $\delta$ , respectivamente. Más recientemente se han descubierto las [D-Ala<sup>2</sup>]deltorfina I y II en la piel de *Phyllomedusa bicolor*, ambos péptidos tienen mayor afinidad y selectividad por el receptor  $\delta$  que la deltorfina (para revisión ver Fontani y col. 1993; McKnight y Rees 1991). Además, se han hallado diversas formas de  $\beta$ -endorfina en la hipófisis del pez pulmonado australiano *Neoceratodus forsteri* (Dores y col. 1988), en el salmón, el holósteo *Amia calva*, y en el tiburón *Squalus acanthias* (para revisión ver Dores y col. 1988; Hammonds y col. 1982). En la Aves, se han detectado péptidos similares a los de los Mamíferos (Naude y col. 1980, 1981; Ryan y col. 1981), aunque, curiosamente, es posible que su efecto sobre la modulación del dolor sea opuesto en algunos casos (Hughes 1990ab). También han sido detectados péptidos y receptores opioides en moluscos e insectos, y sus funciones parecen ser similares a las que ejercen en los Mamíferos (para revisión ver Kavaliers y Hirst 1987).

Es interesante el hecho de que, además de los péptidos opioides, en el encéfalo de los Mamíferos se hayan encontrado pequeñas cantidades de morfina y codeína producidas

endógenamente; sin embargo el significado de este hallazgo es todavía desconocido (para revisión ver Ganong 1989). Además han podido identificarse péptidos opioides propios de la leche: las casomorfina (para revisión ver Cooper y col. 1986; Millan y col. 1991; Sewell 1980; Winslow e Insel 1991).

Por lo que respecta a los mecanismos de degradación de los opioides, se sabe que la encefalinas resultan inactivadas fundamentalmente por hidrólisis enzimática, lo que posiblemente pueda aplicarse a todos los neurotransmisores peptídicos. Las encefalinas resultan rápidamente inactivadas por aminopeptidasas no específicas al separar la tirosina N-terminal. Además existen dos endopeptidasas de alta afinidad ( $K_m = 1 \mu M$ ): la encefalinasa A que hidroliza el puente Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> y la encefalinasa B que rompe la unión Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>. Aunque reciben el nombre de *encefalinasas*, pueden atacar otros péptidos como la  $\beta$ -endorfina y la sustancia P. Se han detectado en las membranas sinápticas del núcleo caudado por lo que se piensa que se encuentran en la misma sinapsis o en su proximidad (para revisión ver Bradford 1988; Ganong 1989).

Para concluir, es importante destacar que los péptidos opioides pueden coexistir con otros neurotransmisores no peptídicos. Así, se ha encontrado que pueden aparecer encefalinas en neuronas dopaminérgicas ventro tegmentales (rata, humanos) y en el cuerpo carotídeo (gato), así como en neuronas noradrenérgicas de los ganglios simpáticos (rata, buey), médula adrenal (varias especies) y locus coeruleus (gato) y coexiste con la serotonina en el bulbo raquídeo (rata y gato). Coexisten también con la serotonina en el



tallo cerebral y la médula espinal. También aparecen junto con la acetilcolina en los nervios preganglionares (gato y rata) y en nervio coclear (cobaya) (para revisión ver Bradford 1988; Cooper y col. 1986; Kimura y col. 1988; Kruk y Pycock 1991; Smith 1989). Además parece claro que los terminales hipotalámicos de las neuronas de oxitocina contienen encefalinas, mientras que los de vasopresina coliberan dinorfinas (para revisión ver Bickell 1985; Kruk y Pycock 1991). Asimismo, existen evidencias inmunocitoquímicas que ponen de manifiesto la coexistencia de encefalina y del factor liberador de corticotropina (CRF) en las neuronas de la fracción parvocelular paraventricular del hipotálamo y en la eminencia media (para revisión ver Lightman y Young 1987).

#### 1.1.1.3 Receptores opioides

Junto a esta variedad de péptidos opioides se han encontrado evidencias de la existencia de múltiples receptores opioides. Inmediatamente tras la identificación de los primeros péptidos comenzó el estudio sobre los posibles receptores opioides. Para identificar un sitio de unión como receptor es necesario demostrar no sólo que la unión tiene lugar sino que el efecto de dicha unión opioide-receptor produce su acción fisiológica. Así, Martin y colaboradores en 1976 realizaron una primera clasificación y postularon la existencia de tres tipos de receptores: mi ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ), y sigma ( $\sigma$ ) a partir de estudios *in vivo* en perro.

La existencia de múltiples receptores opioides ha sido posteriormente confirmada

mediante la utilización de técnicas de bioensayo farmacológico y estudios de unión de ligandos opioides radiactivos. Estas técnicas han dejado claro que no todos los componentes opioides presentan la misma afinidad, ni los antagonistas la misma sensibilidad en los diferentes tejidos. Actualmente se considera la existencia de cinco tipos de receptores de membrana opioides: mi ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ), kappa ( $\kappa$ ), sigma ( $\sigma$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ), siendo los tres primeros los más claros en cuanto a su verdadera identidad (Paterson y col. 1984). Además, se empieza a acumular evidencia que apoya la existencia de un receptor complejo  $\mu$ - $\delta$  (p. ej. Porreca y col. 1987; Rothman y col. 1988, 1990; Schoffemeer y col. 1988), y en algunos trabajos se incluye la posibilidad de un sitio de unión  $\kappa$  en el complejo (Holaday y col. 1986; Rothman y col. 1987). Recientemente se ha postulado también la existencia de un receptor opioide a nivel nuclear: el receptor zeta ( $\zeta$ ), que estaría presente al menos durante las etapas de desarrollo neonatal del sistema nervioso central (Zagon y col. 1991; Zagon y McLaughlin 1992).

Los receptores  $\mu$  tienen una alta afinidad por la  $\beta$ -END (su ligando endógeno prototipo) y por la morfina. Están ampliamente distribuídos en el sistema nervioso central y periférico, con un densidad particularmente alta en el tronco cerebral, núcleo trigémino, médula espinal, sustancia gris periacueductal, caudado putamen, tálamo, amígdala y córtex cerebral (láminas I y IV) (Smith 1989; Lewis y col. 1983ab; Mansour y col. 1991).

Se considera que la estimulación de los receptores  $\mu$  induce hiperpolarización por apertura de canales de potasio y cierre de canales de calcio mediante mecanismos

presinápticos, como parece suceder sobre los terminales de las neuronas aferentes primarias del asta dorsal de la médula espinal (Kruk y Pycck 1991; Smith 1989). En relación con esta acción supresora, algunos receptores  $\mu$  aparecen asociados con la inhibición del sistema de la adenilatociclasa (Kruk y Pycck 1991; Smith 1989). En general, es el tipo de receptor asociado con la analgesia supraespinal, la depresión respiratoria, la euforia y con la aparición de dependencia para la mayoría de los agonistas opioides (para revisión ver McKnight y Rees 1991).

Han sido propuestos dos subtipos de receptores  $\mu$ : los receptores  $\mu_1$  a los que se unen la morfina y la encefalina con similar afinidad y parecen ser responsables de la analgesia supraespinal y los receptores  $\mu_2$  selectivos para la morfina que están relacionados con la depresión respiratoria (Pasternak y Wood 1986).

Los receptores  $\delta$  tienen una gran afinidad por las encefalinas, siendo la met- y leu-encefalinas sus ligandos endógenos prototipo. Se encuentran tanto en el sistema nervioso central como en el periférico y presentan una distribución más difusa que los receptores  $\mu$  excepto en el caudado putamen donde presentan una gran concentración (Bowen y col. 1981; Lewis y col. 1983ab, Mansour y col. 1991). Se han relacionado principalmente con la inducción de depresión respiratoria, integración motora y sensación olfatoria (Mansour y col. 1988), y en la dependencia al agonista opiáceo butorfanol (Jaw y col. 1993). También es posible su implicación en la analgesia espinal (Porreca y col. 1984, 1987). Sobre esta última función se está empezando a acumular evidencia recientemente (Dykstra

1992; Millan y col. 1991), ya que hasta ahora ha sido difícil de discernir dada la falta de agonistas  $\delta$  puros que no reaccionaran con los receptores  $\mu$ . La estimulación de los receptores  $\delta$  produce una hiperpolarización similar a la de los receptores  $\mu$  (Kruk y Pycock 1991; Smith 1989).

Los receptores  $\kappa$  difieren de los anteriores tipos de receptores en que los agonistas  $\kappa$  no pueden revertir los síntomas de abstinencia en animales morfino-dependientes (Kruk y Pycock 1991). En la rata, se han encontrado en la médula espinal, hipocampo, caudado-putamen, sustancia gris periacueductal, núcleo accumbens, amígdala, tálamo, hipotálamo, córtex, eminencia media y núcleo del tracto solitario (Mansour y col. 1988, 1991; Millan 1990). Se ha postulado la posible existencia de dos subtipos de receptores: los  $\kappa_1$  y los  $\kappa_2$  tanto en la médula espinal (Attali y col. 1982) como en el encéfalo (Zukin y col. 1988). Posiblemente también el receptor  $\kappa$  actuaría asociado a la inhibición de la adenilato ciclasa (Attali y col. 1989). Además, y como se expondrá más adelante, los agonistas para los receptores  $\kappa$  muestran distintos tipos de analgesia dependiendo del tipo de estímulo nociceptivo. Las dinorfinas y la neoendorfina se han relacionado con la producción de analgesia espinal, ataxia, sedación y miosis (por ejemplo McKnight y Rees 1991). Dado que los receptores  $\kappa$  no parecen estar implicados en los procesos de dependencia, se ha prestado gran atención a la posible importancia de los agonistas de este receptor como analgésicos en clínica (Dysktra 1992; Millan y col. 1991). Sin embargo, sus efectos aversivos y disfóricos ponen limitaciones a su uso, y en la actualidad se investigan las posibilidades en este campo de los agonistas de los receptores  $\kappa$  con actividad parcial sobre

los receptores  $\mu$  (Dysktra 1992).

Por lo que se refiere a los receptores  $\sigma$ , estos se han relacionado con efectos estimulantes del sistema nervioso autónomo y efectos psicomiméticos. Se localizan especialmente en el hipocampo y periféricamente en el íleon de cobaya en el conducto deferente de ratón (Lord y col. 1977). Estos receptores son los únicos que no parece antagonizar la naloxona (para revisión ver McKnight y Rees 1991).

En cuanto a los receptores  $\epsilon$ , fueron descubiertos en el conducto deferente de rata (Schultz y col. 1979). Aunque se conoce poco acerca de ellos, se piensa que podrían estar implicados en la analgesia mediante la unión de  $\beta$ -END, particularmente la 1-31 (Höllt 1986, Shook y col. 1988).

Finalmente, como se indicó al principio, se ha postulado la existencia de un receptor opioide -el receptor zeta ( $\zeta$ )- que, a diferencia del resto, se encontraría en el núcleo celular. La presencia de este receptor se ha detectado en el cerebelo en desarrollo de la rata (Zagon y col. 1991) y de los seres humanos (Zagon y col. 1990). Parece ser que el principal ligando de este receptor sería la met<sup>5</sup>-encefalina y se ha relacionado con el control de la proliferación celular (Zagon y McLaughlin 1992).

#### I.1.1.4 Ligandos sintéticos

Los ligandos obtenidos artificialmente (empleados incluso antes del conocimiento de la existencia del sistema opioide endógeno) han sido un importante instrumento para la investigación opioide desde sus comienzos hasta nuestros días (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987; McKnight y Rees 1991). En la Tabla 2 se muestran algunos de los agonistas y antagonistas más representativos.

En la actualidad, ha cobrado especial relevancia el empleo de los diversos tipos de antagonistas sintéticos, debido a la valiosa contribución que suponen para un conocimiento más preciso del papel fisiológico de los receptores opioides y sus agonistas endógenos. La naltrexona (Fig. 2a), antagonista opioide con importante aplicación clínica (para revisión ver Way y Way 1992), empleada en este trabajo, presenta el interés de ser capaz de producir de forma prolongada el bloqueo funcional del sistema opioide (Zagon y McLaughlin 1984), lo que nos ha permitido abordar el estudio del papel posiblemente tónico de los péptidos opioides durante el período predestete de forma más eficaz que en algunos trabajos anteriores (Bardo y col. 1982, 1983). Por otra parte la utilización del antagonista irreversible y de larga duración  $\beta$ -funaltrexamina ( $\beta$ -FNA, Fig. 2b) con alta especificidad para los receptores  $\mu$  (Ward y col. 1982ab) y que anteriormente se ha empleado en animales adultos (Adams y col 1987; Arjune y col. 1990; Morris y col. 1988; Rothman y col. 1988, 1990; Sánchez-Blázquez y Garzón 1989; Ward y col. 1985), nos ha posibilitado la investigación de las acciones opioides mediadas a través de receptor  $\mu$  en

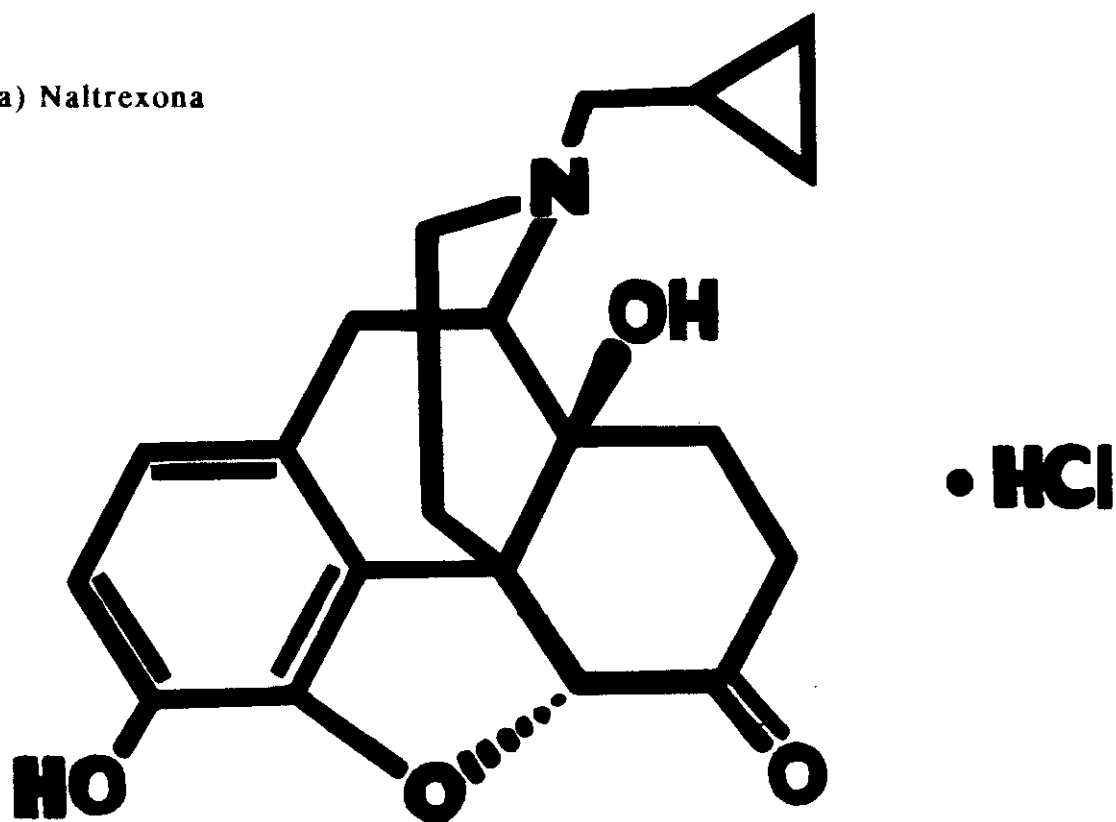
Tabla 2. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS OPIOIDES SINTÉTICOS\*

Compuesto	Selectividad	Acción	Estructura
Morfina	$\mu, \delta \downarrow \downarrow, \kappa \downarrow \downarrow \downarrow$	Agonista	no peptídica
Fentanil	$\mu$	Agonista	no peptídica
Alfentanil	$\mu \uparrow$	Agonista	no peptídica
Ohmefentanil	$\mu \uparrow \uparrow$	Agonista	no peptídica
FK 33,824	$\mu$	Agonista	peptídica
<b>DAMGO</b>	$\mu \uparrow \uparrow$	Agonista	peptídica
Morfeceptina	$\mu \uparrow$	Agonista	peptídica
PL 017	$\mu \uparrow \uparrow$	Agonista	peptídica
Naloxona	$\mu, \delta, \kappa$	Antagonista	no peptídica
<b>Naltrexona</b>	$\mu, \delta, \kappa$	Antagonista	no peptídica
$\beta$ -CNA	$\mu, \delta, \kappa$ irreversible	Antagonista	no peptídica
<b><math>\beta</math>-FNA</b>	$\mu$ irreversible	Antagonista	no peptídica
Ciprodimo	$\mu \uparrow$	Antagonista	no peptídica
Naloxazina	$\mu_1 \uparrow$	Antagonista	no peptídica
CTOP	$\mu \uparrow$	Antagonista	péptido cíclico
TCTAP	$\mu \uparrow \uparrow$	Antagonista	péptido cíclico
DPDPE	$\delta \downarrow$	Agonista	peptídica
DSLET	$\delta \downarrow$	Agonista	peptídica
DSTBULET	$\delta$	Agonista	peptídica
BUBO	$\delta$	Agonista	peptídica
ICI 174864	$\delta$	Antagonista	peptídica
Naltrindol	$\delta \uparrow$	Antagonista	no peptídica
Etilcetociclazocina	$\kappa$	Agonista	no peptídica
U-50488	$\kappa$	Agonista	no peptídica
U-69593H	$\kappa \uparrow$	Agonista	no peptídica
U-62066	$\kappa \uparrow$	Agonista	no peptídica
PD 117302	$\kappa \uparrow \uparrow$	Agonista	no peptídica
nor-BNI	$\kappa$	Antagonista	no peptídica
Mr 2266	$\kappa \downarrow$	Antagonista	no peptídica

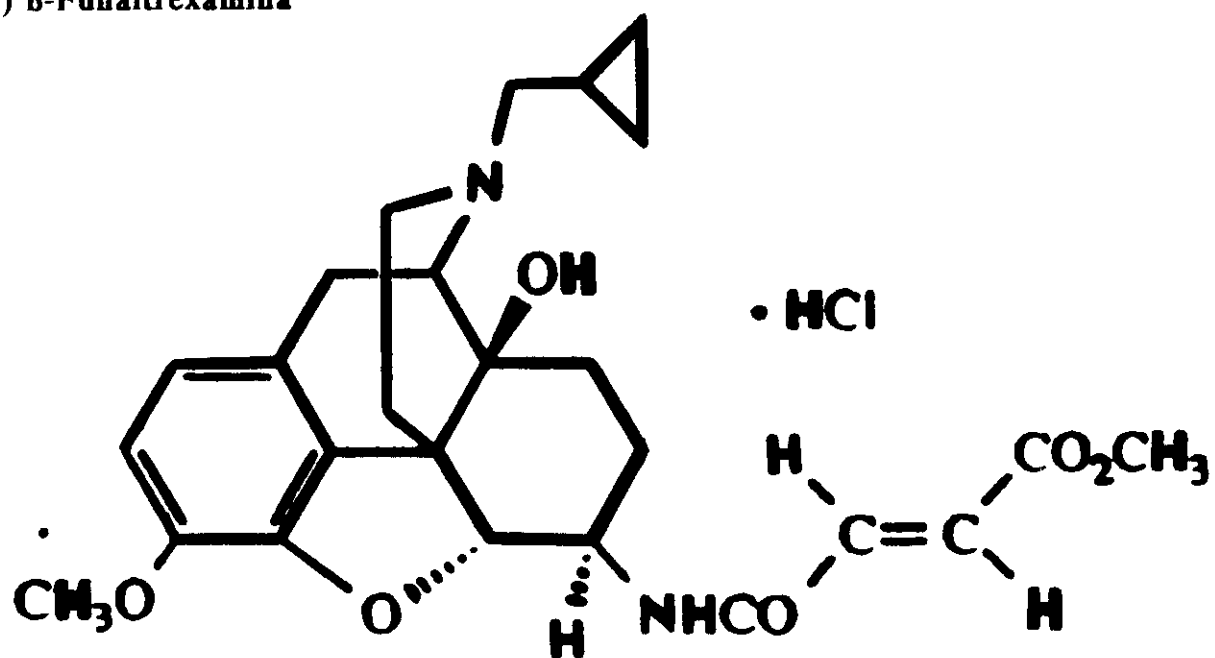
\*Elaborado a partir de McKnight y Rees 1991, Millan y col. 1991 y RBI (cat. 1992-93).

FIG. 2. ESTRUCTURAS MOLECULARES DE LOS FÁRMACOS UTILIZADOS

a) Naltrexona



b) 8-Funaltrexamina





momentos críticos del desarrollo mediante una única administración aguda.

#### I.1.1.5 Funciones del sistema opioide

La investigación llevada a cabo sobre el sistema opioide endógeno desde su descubrimiento ha sido muy intensa y pone de manifiesto la intervención de este sistema en una numerosa gama de funciones básicas como el crecimiento y desarrollo, la locomoción, la regulación de la presión sanguínea, la ventilación pulmonar, los comportamientos sexual y reproductivo, los comportamientos agonísticos, funciones inmunológicas, gasto de energía y regulación del comportamiento alimenticio y de la ingesta de sólidos y líquidos, la termorregulación, la diuresis, la respuesta neuroendocrina a estímulos estresantes, sociales y psicológicos, y la modulación de la nocicepción (para revisión ver Bradford 1988; Dyer y Bicknell 1989; McKnight y Rees 1991; Millan y col. 1991; Fernández-Tresguerres 1989; Zagon y McLaughlin 1992). Así pues, el sistema opioide endógeno parece estar implicado en una amplia variedad de comportamientos, aunque la naturaleza y extensión de esta implicación, como abordaremos más adelante, no está aún del todo clara.

#### I.1.2 DESARROLLO

La investigación sobre los mecanismos del sistema opioide en los animales adultos (especialmente en la rata) ha permitido avanzar en el conocimiento de cómo se desarrolla

la función opioide en el embrión y durante el período postnatal. Los estudios en el desarrollo presentan una serie de limitaciones impuestas por el tamaño del encéfalo en fetos y embriones, dificultades que se acentúan en las especies animales más pequeñas. Además, en animales con cortos períodos de gestación y rápido desarrollo postnatal se necesita determinar con precisión el tiempo de concepción y el momento del nacimiento de los animales. Hay que señalar, además, la existencia de diferencias relativas en el proceso de maduración entre las diversas especies durante el período perinatal.

Expondremos a continuación los datos más relevantes conocidos hasta el momento en lo que se refiere al desarrollo del sistema opioide.

#### 1.1.2.1 Desarrollo de los péptidos opioides

La mayoría de los primeros estudios ontogenéticos se llevaron a cabo en el sistema nervioso central de la rata. Las investigaciones realizadas en las etapas fetales han demostrado que los distintos péptidos opioides están presentes en el sistema nervioso central antes del nacimiento. Su desarrollo no es completo hasta después del nacimiento y es hacia la tercera semana postnatal cuando se alcanzan los mayores niveles para casi todas las regiones cerebrales, a excepción del cerebelo que los alcanza durante la primera semana (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987). No existe un paralelismo en el desarrollo de los tres precursores y hay diferencias regionales para algunos péptidos en el período postnatal. Los datos obtenidos indican que la ontogénesis de los 3 precursores

ocurre independientemente y que sus productos opioides tienen distintos patrones ontogenéticos. Así, por ejemplo, en un estudio inmunocitoquímico comparativo para la dinorfina A y encefalinas se encontraron diferencias para el patrón de desarrollo en la formación hipocampal (Gall 1984) y en otros trabajos para la  $\beta$ -endorfina y met-enkefalina en el *encéfalo anterior*, *cerebelo*, *tronco encefálico*, *hipocampo*, *córtex*, *estriado* y *amígdala* (Bayon y col. 1979; Tsang y col. 1982ab). Los distintos patrones ontogenéticos observados para los péptidos parecen reflejar la existencia de una activación enzimática diferencial durante el desarrollo. En este sentido, los estudios comparativos de la ACTH y la  $\beta$ -END durante la ontogenia (Kapcala 1983, 1986) y de las formas N-acetiladas y no N-acetiladas de  $\beta$ -endorfina (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987) pone de relieve unas diferencias en el perfil de desarrollo tanto en el *encéfalo* como en la *hipófisis de rata* que podrían ser atribuibles a ese distinto procesamiento.

#### I.1.2.2 Desarrollo de los receptores opioides

El estudio del desarrollo de los receptores opioides se ha llevado a cabo principalmente utilizando las técnicas de unión de ligando a receptor. El principal método empleado se basa en la utilización de homogenados de membrana de tejido encefálico. En los primeros estudios se utilizaron ligandos no selectivos como la naloxona, por lo que no fue posible obtener una buena información sobre el desarrollo de los distintos tipos de receptores hasta que aparecieron ligandos selectivos tales como el DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>, Gly-ol]-encefalina) para los receptores  $\mu$ , el DPDPE ([D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>2</sup>]-encefalina) que presenta

alta selectividad para los sitios de unión  $\delta$ , así como ligandos específicos para los receptores  $\kappa$ : U-50488H y U-69593. La utilización de estos compuestos selectivos ha permitido conocer la existencia de una ontogenia diferencial para los distintos tipos de receptores. Los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  son los primeros en aparecer, mientras que los  $\delta$  están ausentes hasta la segunda semana postnatal en la rata. En esta especie el desarrollo total de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  ocurre en la tercera y cuarta semana respectivamente (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987). Aunque existen algunas lagunas en el conocimiento del perfil de desarrollo de los receptores  $\kappa$ , parece que, al igual que los receptores  $\delta$ , su desarrollo completo es más tardío. Algunos resultados sugieren que su desarrollo completo no tiene lugar, hasta el día 35 postnatal (Barr y col. 1986; Hill y col. 1984; Spain y col. 1985). Sin embargo, trabajos posteriores utilizando un ligando altamente selectivo para los receptores  $\kappa$  (U-69593) han demostrado la presencia de receptores  $\kappa$  en el encéfalo de rata en períodos postnatales tempranos presentando su mayor desarrollo a los 10 días después del nacimiento (Kitchen y col. 1990). Al comparar el número de sitios de unión  $\kappa$  con este ligando selectivo y los obtenidos utilizando ligandos menos específicos se pudo comprobar que el número de sitios de unión obtenido era menor, lo que sugiere que el U-69593 podría unirse a un subtipo del receptor  $\kappa$  (el receptor  $\kappa_1$ ), que se encuentra en menor concentración en el encéfalo de rata (Zukin y col. 1988).

Se han señalado diferencias sexuales en la localización autorradiográfica de receptores opioides utilizando  $^3\text{H}$ -naloxona. Según estos estudios, se produce en las hembras un incremento en el área preóptica medial de la densidad de receptores opioides

desde el día 3 al día 10 que no se produce en los machos (Hammer 1985). Se han descrito recientemente además diferencias sexuales en el desarrollo de los receptores  $\mu$  hipotalámicos (Limonta y col. 1991).

Se ha estudiado la ontogenia de los receptores opioides también en otras especies. En el ratón se ha comprobado que su patrón ontogenético para el receptor  $\delta$  es parecido al de la rata. Los estudios en animales con períodos perinatales más largos (como en el pollo y el cordero) demuestran un mayor grado de madurez en los receptores al nacimiento.

Finalmente, hay que mencionar dentro de esta sección sobre desarrollo que se ha venido considerando que, en general, las regiones más caudales del encéfalo madurarían antes que las más anteriores (Jacobson 1978). Parece haber indicios de que esto también sería aplicable a los receptores opioides (ver por ejemplo Bardo y col. 1981, 1982), si bien este extremo no está plenamente confirmado y parece haber algunas discrepancias entre el desarrollo de los receptores y los péptidos opioides (Bayon y col. 1979; Loughlin y col. 1985; McDowell y Kitchen 1987).

### I.1.3 PLASTICIDAD

Es un fenómeno bien conocido la capacidad del sistema nervioso central de los Mamíferos para adaptarse como respuesta a las lesiones o a distintos estímulos

farmacológicos o ambientales (para revisión ver, por ejemplo, Baron y col. 1985; Giardino 1990; Fuller 1984; Sharma y col. 1988). Dentro de este contexto, el sistema opioide endógeno parece presentar una especial *plasticidad* o capacidad de ajuste a los distintos estímulos ambientales, farmacológicos o fisiológicos. La plasticidad de los receptores opioides ha sido puesta de manifiesto a través de distintos estudios comportamentales, bioquímicos y morfológicos en la rata adulta (Bardo y col. 1982, 1983; Giardino 1990; McDowell y Kitchen 1987; Morris 1991; Sharma 1988; Tang y Collins 1978; Tempel y col. 1982, 1984; Zadina y col. 1985). En una serie de estudios previos, otros autores han mostrado que tras finalizar un tratamiento de bloqueo opioide funcional se produce una supersensibilidad del sistema debida a una subsecuente elevación marcada del número de receptores (Bardo y col. 1982, 1983; Sharma y col. 1988; Baron y col. 1985). Parece probable que a esta subida del número de receptores le acompañe una elevación de los niveles de opioides endógenos (Bardo y col. 1982, 1983; Sharma y col. 1988; Tempel y col. 1985; Zagon y McLaughlin 1984). Sin embargo, los efectos de la administración crónica de agonistas sobre los niveles de receptores son controvertidos y en algunos casos parecen depender del tipo de agonista empleado (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987; Temple y col. 1988; Zadina y col. 1985). Además han aparecido evidencias de que la plasticidad de este sistema no presenta las mismas características en las distintas etapas del desarrollo, ni en las ratas neonatales y las adultas (Bardo y col. 1982, 1983; Sirinathinghi y col. 1985; Tempel y col. 1988; Zadina y col. 1985). Los receptores opioides se encuentran en rápido desarrollo durante las primeras semanas postnatales, por lo que serían más susceptibles a las distintas alteraciones, confiriendo a estas etapas

tempranas del desarrollo una plasticidad única. Es interesante señalar que los trabajos existentes en la literatura parecen indicar que el receptor  $\mu$  sería el más sensible a los tratamientos farmacológicos neonatales (McDowell y Kitchen 1987; Temple y col. 1988; Zadina y col. 1985), además de tener un papel importante en la modulación de distintas funciones durante el desarrollo (Bailey y Kitchen 1987; Hammer y col. 1989; McDowell y Kitchen 1987; Roth y col. 1980). Por otra parte, se ha postulado que las modificaciones postsinápticas inducidas sobre el sistema opioide podrían tener consecuencias a nivel presináptico, que serían las responsables de las alteraciones comportamentales observadas a largo plazo (Bardo y col. 1983; Harry y Rosecrans 1979; Kastin y col. 1980; Meyerson y col. 1988; Sirinathinghi y col. 1985). Las consecuencias de la plasticidad opioide sobre el estado funcional de otros sistemas de neurotransmisión a nivel central, así como hasta *qué punto su actividad está modulada por una acción tónica opioide*, son temas poco conocidos. Aunque los efectos de algunas sustancias tanto agonistas como antagonistas opioides sobre los sistemas estrechamente relacionados como los monoaminérgicos han sido investigados por otros autores tanto en el animal adulto (Baron y col. 1985; Roth y 1980; Sharma 1988) como en ratas en la etapa predestete (Bardo y col. 1982; Roth y 1980), esta cuestión no está aún resuelta. La falta de resultados positivos ha podido deberse en algunos casos (Bardo y col. 1982) a la utilización de antagonistas opioides de corta duración, concretamente la naloxona, lo que nos ha llevado en este trabajo a emplear la naltrexona, un antagonista de efectos más prolongados, para intentar clarificar el alcance de las interacciones entre el sistema opioide y los sistemas monoaminérgicos.

En la presente Tesis Doctoral se ha tratado de aportar nuevas evidencias que pudieran contribuir a aclarar las características y el alcance de la plasticidad de los receptores opioides. En este sentido, nuestro trabajo se inscribe, en su primera parte, dentro de la investigación que pretende clarificar la diferente plasticidad del sistema opioide durante el desarrollo postnatal y nos hemos centrado en edades consideradas dentro de posibles períodos críticos tanto para el desarrollo del sistema nervioso y endocrino, como para la función opioide en particular. Así, a los 7 días parece establecerse la respuesta de  $\beta$ -endorfina (pero no de corticosterona) al estrés (Iny y col. 1987) y se alcanza el pico predestete de efectividad analgésica de la morfina para la prueba nociceptiva de la placa caliente (Blass y col. 1993). Se considera que hacia el final de la segunda semana postnatal finaliza el proceso de sinaptogénesis y el incremento de la densidad de terminales de catecolaminas (para revisión ver Kellog 1992) y aparece la respuesta de corticosterona al estrés (Iny y col. 1987). Además, existe una clara diferencia entre la sensibilidad de los receptores opioides a la administración de morfina entre la primera y segunda semanas (Tempel 1988). Hacia la tercera semana los receptores  $\mu$  y  $\delta$  alcanzan los niveles del adulto (Bardo y col. 1981; McDowell y Kitchen 1987; Petrillo y col. 1987; Spain y col. 1985; Tsang y col. 1982ab; Volterra y col. 1986), y a los 30 días de edad aparece la primera influencia de la administración de opioides sobre la liberación de corticosterona, que queda plenamente establecida al día 45 (Bailey y Kitchen 1987). En la segunda parte de esta Tesis hemos abordado las repercusiones de dicha plasticidad sobre el desarrollo de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, así como sobre el establecimiento de una amplia gama de pautas comportamentales. Paralelamente, se ha realizado un seguimiento



continuado de diversos parámetros del desarrollo somático y neurobiológico. En todos los casos se han utilizado antagonistas opioides de larga duración para conseguir el bloqueo funcional del sistema opioide.

#### 1.1.4 SISTEMA OPIOIDE Y NOCICEPCIÓN

El dolor es una experiencia desagradable que no es posible definir exactamente por ser subjetiva. Sin embargo, las respuestas fisiológicas asociadas al dolor sí pueden ser registradas y medidas a través de diversos tipos de pruebas nociceptivas. El ser vivo está constantemente sometido a un gran número de estímulos nocivos. El dolor actúa avisando de los posibles daños y lesiones producidas a causa de este tipo estímulos. El dolor representa por tanto en estos casos un sistema eficaz de alarma y, como consecuencia, de defensa de la integridad física del individuo. De entre las múltiples funciones biológicas en las que parece estar implicado el sistema opioide endógeno, las acciones antinociceptivas de los opioides se han situado tradicionalmente en un lugar destacado de la investigación en este campo, debido a su interés para la especie humana. Dada la multiplicidad de sistemas opioides no es sorprendente que el estado actual de la investigación opioide en relación con el dolor revele una gran complejidad.

##### 1.1.4.1 Modulación del dolor por el sistema opioide

Se considera que los dos sitios principales en los que se produce la modulación

opioidégica del dolor son el enćfalo y la ḿdula espinal (Basbaum y Fields 1984; Millan 1986; Yaksh y Neneihed 1985). Las ́reas mesenćfalo/puente tienen una especial relevancia en la accíon antinociceptiva de los opioides. La microinyeccíon de cantidades ḿnimas de morfina dentro de la sustancia gris periacueductal son capaces de producir antinocicepcíon (Tsou y Jang 1964). Como ya se menciońo, tambíen se produce analgesia por estimulacíon eĺctrica de esta zona y del ńcleo del rafe dorsal, que es parcialmente antagonizada por naloxona, lo que indica una mediacíon opioidégica en los efectos de esta estimulacíon (Akil y col. 1976; Mayer y col. 1971). Adeḿas, y como indicamos anteriormente, la sustancia gris periacueductal y las regiones del tallo cerebral adyacentes son ricas en receptores opioides (ver seccíon I.1.1.3), sobretodo  $\mu$  y  $\kappa$  (tambíen aparecen receptores  $\delta$ , aunque en menor cuant́ia), y en ṕptidos opioides:  $\beta$ -endorfina, dinorfina y encefalinas. Algunos estudios recientes indican que la estimulacíon eĺctrica del mesenćfalo que produce antinocicepcíon disminuye la concentracíon de  $\beta$ -END (pero no de dinorfina ni de met-enkefalina) en la sustancia gris periacueductal (Millan y col. 1987). Despúes de la estimulacíon eĺctrica repetida parece producirse un descenso en la antinocicepcíon inducida y los efectos de la morfina son mucho menores. Estos datos demostraŕan la existencia de tolerancia cruzada entre la morfina y la  $\beta$ -endorfina, indicando que la liberacíon de  $\beta$ -END y la activacíon de los receptores  $\mu$  en la sustancia gris periacueductal desempéan un papel importante en la antinocicepcíon inducida por estimulacíon (Millan y col. 1987, 1991). Adeḿas, estos resultados apoyan el supuesto de que los receptores  $\mu$  son un factor importante en la modulacíon del dolor en el enćfalo. Existen tambíen indicaciones de que la activacíon de los recptores  $\delta$  tendŕia un efecto

similar. En los trabajos de Porreca y colaboradores (1984, 1987) se pudo observar que no existía tolerancia cruzada entre la morfina y los agonistas de receptor  $\delta$  administrados intracerebroventricularmente (icv), así como que la analgesia inducida por los agonistas selectivos  $\delta$  se revertía por antagonistas  $\delta$  que no eran capaces de suprimir la analgesia por morfina. Estos resultados llevaron a la conclusión de que en la analgesia supraespinal no sólo intervienen los receptores  $\mu$ , sino también los receptores  $\delta$ .

Como ya se mencionó en la sección de *receptores opioides*, otros datos sugieren la existencia de un complejo formado por los receptores  $\mu$  y  $\delta$  interactuando entre sí (Porreca y col. 1987; Rothman y col. 1988, 1990; Schoffemeer y col. 1988). A nivel supraespinal los receptores  $\delta$  intervendrían en la modulación antinociceptiva de dos formas: directamente, mediante la acción de sus agonistas e independientemente de la actividad de otros receptores, y a través de su acción indirecta potenciando la acción de los agonistas  $\mu$  por la interacción no competitiva entre los agonistas  $\mu$  y  $\delta$ .

Por lo que se refiere a la implicación de los receptores  $\kappa$  en la antinocicepción supraespinal, es importante considerar que tanto las dinorfinas como los propios receptores  $\kappa$  están estratégicamente localizados para la modulación de la nocicepción en los distintos niveles de su procesamiento. Así, en el encéfalo son abundantes en la sustancia gris periacueductal y en el tálamo, regiones implicadas en la integración de la información nociceptiva ascendente y también relacionadas con las rutas inhibitorias del dolor que descienden a la médula espinal. Además también el sistema límbico y el córtex

cerebral -implicados en los aspectos afectivos y emocionales del dolor- son regiones ricas en receptores  $\kappa$  y encefalinas (Millan 1990). Sin embargo, el papel de la activación de los receptores  $\kappa$  en la antinocicepción a nivel encefálico, y más concretamente, su intervención ante los estímulos dolorosos térmicos ha sido considerada con frecuencia poco significativa. Esta cuestión ha sido revisada recientemente y se ha comprobado lo contrario. Los estudios realizados por Millan y colaboradores (1989, 1991) en la rata demuestran que, además de los receptores  $\kappa$  de la médula espinal también los del encéfalo pueden intervenir en la antinocicepción tanto frente a los estímulo mecánicos como térmicos. Sin embargo, en el caso de los estímulos térmicos -y en contraste con los receptores  $\mu$ - la acción de los agonistas  $\kappa$  es dependiente de la intensidad del estímulo.

Además del mesencéfalo y del puente, también las áreas límbicas están implicadas en los fenómenos analgésicos o antinociceptivos, sin embargo este efecto es menos conocido que el que se produce en el tronco encefálico (para revisión ver Beitz 1992). La dificultad estriba en la implicación del sistema límbico en la respuesta emocional al dolor . La morfina puede interactuar con los receptores  $\mu$  del sistema límbico disminuyendo los niveles de ansiedad y produciendo euforia (relacionada con los fenómenos de adicción) (para revisión ver Emrich y Schmaus 1991; McKnight y Rees 1991). Los agonistas  $\kappa$ , por el contrario, tienen propiedades disfóricas (Dysktra 1992) y se cree que no tienen efectos antinociceptivos a través del sistema límbico (para revisión ver Millan y col. 1991). En contraste con los agonistas  $\mu$ , los agonistas  $\kappa$  se muestran inactivos frente a la estimulación eléctrica de la cola y no son capaces de modificar la respuesta de vocalización (Millan

1989), que se considera que está integrada a niveles superiores y podría ser indicativa del componente afectivo/emocional del dolor (Carr y Bak 1988; Paalzow y Paalzow 1975; Vidal y Jacob 1985). Esta diferencia entre las acciones de los agonistas  $\mu$  y  $\kappa$  podría estar relacionada con sus distintos efectos sobre el estado emocional.

Por lo que se refiere al nivel espinal, es en el asta dorsal (donde tiene lugar la entrada nociceptiva) la región donde tiene lugar la modulación opioidérgica de la nocicepción (Yaksh y Neneihed 1985). Esta zona presenta grandes concentraciones de péptidos opioides (así como de otros neuropéptidos) (para revisión ver Satoh y Kuraishi 1991; Wiesenfeld-Hallin y Xu 1992) y se encuentran los tres tipos de receptores ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ) (para revisión ver Lewis y col. 1983ab; Morris 1991; Satoh y Kuraishi 1991) en alta densidad. Existen evidencias de que, al igual que ocurría en el encéfalo, determinados estímulos nociceptivos producen la activación de los receptores  $\mu$  en la modulación dolorosa espinal (Millan y col. 1991). La D-Ala-D-Leu-encefalina (DADLE, ligando sintético del receptor  $\delta$ ) también tiene efecto en la modulación dolorosa a nivel espinal lo que indica la implicación de los receptores  $\delta$  y se ha encontrado que se produce un vaciado del contenido de met-encefalina en la médula espinal frente a un estímulo nociceptivo (Millan 1986). Los resultados de Porreca y colaboradores (1984) en ratón utilizando la prueba térmica de placa caliente indicaban que aunque la antinocicepción supraespinal tenía componentes  $\mu$  y  $\delta$ , la antinocicepción a nivel espinal parece mediada exclusivamente por receptores  $\delta$ .

El papel de los receptores  $\kappa$  en la mediación espinal no está enteramente aclarado, dado que la inyección intraperitoneal de dinorfina induce flaccidez motora, lo cual dificulta diferenciar la verdadera antinocicepción de la incapacidad motora. Sin embargo sí ha podido demostrarse que el papel de las dinorfinas en los procesos de antinocicepción es más importante a nivel espinal que encefálico (para revisión ver Satoh y Kuraishi 1991, Millan y col. 1991). Además, a diferencia de los agonistas  $\mu$  (morfina y fentanil) que presentan una actividad antinociceptiva independiente de la intensidad tanto para los estímulos nociceptivos térmicos como de presión de la cola, los agonistas selectivos del receptor  $\kappa$  tienen un efecto dependiente de la intensidad para los estímulos térmicos. A bajas intensidades son capaces de actuar contra el dolor, mientras que su acción desaparece a medida que se aumenta la intensidad (Millan 1986, Millan 1989, Millan y col. 1991).

En los últimos años se han acumulado datos que señalan que además de en el encéfalo y la médula espinal, la activación de los receptores opioides localizados periféricamente tendría también un papel antinociceptivo. Una de las primeras evidencias fue la aportada por Wood en 1855 quien señaló que se observaban efectos analgésicos cuando la morfina se inyectaba localmente en las zonas periféricas doloridas. Recientemente (Stein 1991; Stein y colaboradores 1989, 1990) se ha sugerido un papel de los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  en la antinocicepción producida en tejidos inflamados. Además, también se ha relacionado a los péptidos opioides adrenales con la analgesia inducida por estrés (Lewis y col. 1982; Kimura y col. 1988)

#### I.1.4.2 Mecanismos no opioidérgicos

A pesar de que es especialmente importante la modulación ejercida por el sistema opioide endógeno sobre la percepción del dolor, la alta complejidad de las bases anatómicas y neuroquímicas de los sistemas nociceptivos endógenos implica la intervención e interacción de otros sistemas de neurotransmisión y neuromodulación. Los aminoácidos excitatorios glutamato y aspartato parecen estar relacionados con muchas de las proyecciones descendentes hacia el tronco encefálico que parten de regiones más anteriores implicadas en la antinocicepción, así como con parte del circuito interno del tronco encefálico como la vía sustancia gris periacueductal-bulbo raquídeo ventromedial (para revisión ver Beitz 1992). Las monoaminas parecen tener también cierta implicación en este circuito intrínseco del tronco cerebral y en la modulación de las áreas antinociceptivas del encéfalo anterior, sin embargo donde parecen tener un papel clave es en las vías bulbo-espinales asociadas con la antinocicepción. La *coactivación* de los sistemas espinobulbares catecolaminérgicos e indolaminérgicos parece ser un rasgo característico de las vías descendentes antinociceptivas (para revisión ver Beitz 1992). Además la serotonina parece ser esencial para la mediación en la inhibición descendente del dolor, y en particular para la analgesia opioide (por ejemplo Baron y col. 1985; Mayer 1979; Nakazawa y col. 1991; Samanin y col. 1970; Yaksh y Tyce 1979) aunque también hay indicaciones de la participación de la dopamina (Rosecrans y col. 1977). Por otra parte parece claro que dentro de la sustancia gris periacueductal las neuronas productoras de ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) tienen efecto inhibitor sustancial sobre la neuronas que

se proyectan hacia el bulbo ventromedial (Williams y Beitz 1990) y, además, las encefalinas y  $\beta$ -endorfina interaccionan con interneuronas GABAérgicas para desinhibir el *output* neuronal hacia el bulbo ventromedial (Depaulis y col 1985; Moreau y Fields 1986). El GABA también parece estar relacionado con algunas vías antinociceptivas que se proyectarían desde la sustancia nigra a la sustancia gris periacueductal (Williams y Beitz 1990). La acetilcolina aparece como posible modulador del dolor en la proyecciones desde el núcleo cuneiforme al bulbo ventromedial (para revisión ver Beitz 1992). La hormona calcitonina, asimismo, parece estar implicada con la modulación del dolor a nivel central y periférico puede interactuar con el sistema opioide en dicha regulación (para revisión ver Goicoechea 1991, Tesis de Licenciatura). Finalmente, otros neuropéptidos no opioides están asociados con las vías reguladoras del dolor a distintos niveles. Así, la neurotensina y la somatostatina intervienen en la vía que se proyecta desde la sustancia gris periacueductal al bulbo raquídeo ventromedial, los péptidos sustancia P y neurotensina están asociados a la proyección desde el hipotálamo lateral a la sustancia gris periacueductal y la sustancia P también parece estar implicada en la vía desde el núcleo cuneiforme al bulbo ventromedial (para revisión ver Beitz 1992). Sin embargo sus funciones precisas requieren mayor análisis y clarificación.

El asta dorsal de la médula espinal contiene una serie de neuropéptidos no opioides, algunos de los cuales parecen estar implicados en la mediación y modulación del dolor. Tal es el caso de la sustancia P, la somatostatina, el péptido intestinal vasoactivo, la galanina y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (para revisión ver Dalsgaard



1988; Jordan y Oehme 1985) que coexisten en los terminales axónicos de las neuronas aferentes primarias, para los que se ha propuesto recientemente un modelo de mediación e interacción en la regulación del dolor a nivel del asta dorsal (Wiesenfeld-Hallin y Xu 1992). Por otra parte, Kuraishi y colaboradores en 1985 postularon que la sustancia P y la somatostatina estarían implicados en la transmisión de los estímulos nociceptivos mecánicos y térmicos, respectivamente. Los datos obtenidos posteriormente han apoyado esta hipótesis. Así, la administración intratecal de antisuero contra la sustancia P o la somatostatina en la rata producía una antinocicepción específica para cada modalidad en las pruebas nociceptivas de presión de la pata y placa caliente, respectivamente (Nance y col. 1987; Satoh y Kuraishi 1991; Ohno y col. 1988).

Además, los opioides pueden interactuar con la sustancia P y otras sustancias implicadas en los procesos inflamatorios como la bradiquinina y las prostaglandinas en los terminales nerviosos periféricos (para revisión ver Dray y Perkins 1993; Ferreira y col. 1982; Jordan y Oehme 1985; Stein y col. 1990). Por otra parte, se ha propuesto que los corticosteroides adrenales tendrían también un papel importante en la regulación de la analgesia opioide (para revisión ver Lewis y col. 1980, Terman y col. 1986).

Puede concluirse pues que en todos los niveles del sistema nervioso relacionados con la modulación del dolor existe una interacción compleja y posiblemente una actuación en paralelo de mecanismos opioidérgicos y no opioidérgicos (para discusión ver Beitz 1988; Iggo y col. 1985; Lewis 1986; Lewis y col. 1980; Reid 1992; Satoh y Kuraishi 1991;

Wiesenfeld-Hallin y Xu 1992).

Finalmente, hay que añadir que esta complejidad en la regulación de la nocicepción también ha sido puesta de manifiesto en los trabajos con ratas neonatales (Alleva y col. 1986; Enters y Spear 1988; Laviola y Loggi 1992; Pujol y col. 1993; Spear y col. 1985).

#### 1.1.4.3 Pruebas nociceptivas

Para el estudio de las posibles alteraciones de los umbrales nociceptivos producidas por un determinado compuesto o circunstancia (estrés, alteraciones del ambiente físico, psicológico o social) es necesaria la utilización de unas pruebas nociceptivas específicas. En la mayoría de los casos, mediante estas pruebas se evalúa si aumenta o disminuye el tiempo de aplicación del estímulo porque se retrase (analgesia) o adelante (hiperalgesia) la aparición de la conducta de evitación. Existen otro tipo de pruebas en las que se contabiliza el número de respuestas al estímulo nocivo durante un determinado intervalo de tiempo preestablecido (por ejemplo, el número de contorsiones inducidas por la inyección intraperitoneal de ácido acético).

Los estímulos nociceptivos pueden ser de naturaleza diversa, lo que nos permite clasificar las pruebas nociceptivas en *químicas* (el estímulo doloroso es una sustancia irritante como el ácido acético o la fenilbenzoquinona) y *físicas*. Dentro de este último grupo se pueden distinguir las *pruebas eléctricas* (el dolor es producido por un estímulo

eléctrico), las *mecánicas* (la aplicación de un estímulo de presión creciente es el elemento productor del dolor) y las *térmicas* (que emplean estímulos de calor o frío).

\* Pruebas químicas

En este tipo de pruebas la inyección intraperitoneal de una sustancia irritante produce en el ratón o la rata una pauta que se conoce como *contorsión*. Esta conducta se manifiesta como una onda de alargamiento y constricción que atraviesa caudalmente la pared abdominal del animal acompañada de un retorcimiento del tronco y seguido de las patas traseras (Collier y col. 1968; Goicoechea 1991, Tesis de Licenciatura). En estas pruebas se valora el número de contorsiones realizadas por el animal en un período de tiempo preestablecido.

\* Pruebas físicas

**§ Pruebas eléctricas**

En estas pruebas se utiliza el estímulo eléctrico como inductor de dolor. Dentro de este tipo podemos citar las pruebas de estimulación de pulpa dentaria del conejo (Piercey y Shroeder 1980) y de estimulación de la cola del ratón (para revisión ver Turner 1965). Dentro de este grupo cabe destacar la prueba de estimulación eléctrica de la cola en la rata (Carrol y Lim 1960; Naranjo y col. 1982; Schimdt y col. 1989) que permite evaluar

diferentes reacciones al dolor integradas a distintos niveles del sistema nervioso central. Esta prueba ha sido recientemente utilizada para el estudio del desarrollo de la nocicepción (Viveros y col. 1993) y en relación con el sistema opioide endógeno (Pujol y col. 1993).

### **§ Pruebas mecánicas**

En este tipo de pruebas el estímulo de presión se aplica bien a la cola o, más frecuentemente, en la pata trasera, y el animal empleado comunmente es la rata. Tradicionalmente se ha empleado para valorar los efectos analgésicos de distintas sustancias al someter a una presión creciente la pata del animal a la que previamente se ha producido una inflamación por inyección de una sustancia irritante (generalmente formalina, *carrageenan*, prostaglandinas o adyuvante de Freund) (Randall y Sellito 1975). La aparición de nuevas demandas en los estudios farmacológicos que empiezan a dirigir sus intereses hacia las respuestas nociceptivas en las edades neonatales, así como de una mayor sensibilidad social frente al tipo de manipulación al que se somete a los animales de experimentación, han hecho que este tipo de pruebas empiecen a verse modificadas. Así, el aparato comercial empleado para la prueba de Randall-Sellito, anteriormente citada, ha sido adaptado para evitar el daño tisular, especialmente en las ratas más jóvenes (Kitchen 1984), y para estos trabajos ya no se hace necesario causar ninguna inflamación al animal. En esta Tesis Doctoral se ha empleado dicha modificación en todos los casos para la prueba de la *presión de la pata* (ver la sección III.2.1.4 de *Material y métodos*), prefiriéndose esta prueba a la de la *presión de la cola* por presentar una menor dispersión

en los datos y una mayor sensibilidad a la mediación opioide (Kitchen 1984).

### § Pruebas térmicas

Entre las pruebas térmicas más empleadas está la de la *placa caliente* (Eddy y Leibach 1953; Tyers 1980) en la que se valoran las reacciones del animal situado en una placa calentada previamente. Se pueden tomar como parámetros para dar fin a la exposición a la prueba el lamido de las patas anteriores, de las patas traseras y el salto, entre otros; cada uno de ellos relacionados con un tipo de mediación diferente del fenómeno doloroso (Goicoechea 1991, Tesis de Licenciatura). Otra prueba utilizada frecuentemente es la *retracción de la cola* o *tail-flick* (D'Armour y Smith 1941; Turner 1965). En ella se mide el tiempo de reacción tras el cual el animal retrae la cola de la acción de un haz luminoso de intensidad suficiente como para ser nociceptivo. En la prueba de *inmersión de la cola* o *tail immersion* (Jansen y col. 1963; Kitchen y col. 1984) el estímulo doloroso es producido al sumergir la cola del animal en un baño de agua caliente, a una temperatura preestablecida, y se valora el tiempo que tarda el animal en retirar la cola del agua. Este último tipo de prueba térmica ha sido utilizado para la realización de esta Tesis y durante el transcurso de la misma se observó la conveniencia de modificar el protocolo original (Kitchen y col. 1984) en uno de los apartados, para adecuarlo a las edades más tempranas del desarrollo (ver sección III.2.2.4 de *Material y métodos*).

Las pruebas nociceptivas son una herramienta de trabajo ampliamente utilizada en los estudios farmacológicos, y de entre ellos, particularmente, en la investigación del sistema opioide. Es de señalar que, recientemente, se ha suscitado un especial interés en este campo en lo que se refiere a los mecanismos neurales subyacentes a las respuestas a los distintos estímulos nociceptivos (Millan 1990). En esta línea, las pruebas empleadas en la presente Tesis Doctoral *-presión de la pata e inmersión de la cola-* fueron elegidas, precisamente, por emplear dos tipos distintos de estímulos que se sabe que están regulados a través de distintas vías neurofisiológicas que implican al sistema opioide. Así, mientras los receptores  $\mu$  parecen ser los más implicados en la regulación de la nocicepción producida por estímulos térmicos, los receptores  $\kappa$  intervendrían de forma más importante en la producida por otro tipo de estímulos, especialmente los de presión (Kitchen 1984, Tyers 1980).

## I.2 INTERACCIONES SISTEMA OPIOIDE MONOAMINAS

Los estudios en la edad adulta indican la relación entre los sistemas monoaminérgicos y el sistema opioide endógeno. Así, por ejemplo, se ha observado que la exposición crónica a morfina (agonista opioide general) produce incrementos en el porcentaje y/o en la afinidad de los receptores  $D_2$  para dopamina en hipotálamo y estriado, aunque el tratamiento crónico con met-enkefalina (péptido opioide endógeno) no tiene efecto sobre dichas variables (Steece y col. 1986). Además, la administración de morfina y agonistas de los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  produce elevaciones en los niveles plasmáticos de

catecolaminas, posiblemente a través de su acción sobre regiones discretas del hipotálamo y tronco encefálico (para revisión ver Hoehe y Duka 1993). Por otra parte, se ha propuesto que los opioides actuarían sobre neuronas dopaminérgicas mesolímbicas incrementando su liberación en situaciones de estrés (Kamata 1987). Además, se ha descrito que la administración de morfina acelera la biosíntesis de catecolaminas en el encéfalo entero de ratas controles, pero no en las tolerantes a morfina (Barón y col. 1985; Clouet y Ratner 1970). A su vez, la supresión permanente de DA en ratas neonatales afecta a la antinocicepción producida por morfina en animales adultos (Rosecrans y col. 1977), y la administración de 5,7-dihidroxitriptamina (una toxina para la serotonina) produce una disminución del número de receptores opioides de la médula espinal de ratas en desarrollo (Kirby y Mattio 1982). Además, se ha visto que distintos agonistas de serotonina son capaces de incrementar los niveles de leu-encefalina en estriado y de disminuirlos en tálamo+hipotálamo acompañados de una bajada en la concentración de 5-HT ó 5-HIAA, en ratas adultas (Kmieciak-Kołada y Kowalski 1986). Los niveles de  $\beta$ -endorfina (agonista opioide endógeno) en la hipófisis anterior e intermedia están regulados por DA y 5-HT hipotalámicas, siendo inhibidora la DA y estimuladora la 5-HT (para revisión ver Forman y col. 1990). Además en las ratas ancianas se ha observado una elevación de los niveles de  $\beta$ -endorfina en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis causados por elevaciones de la función serotoninérgica y descenso de la dopaminérgica, respectivamente (Forman y col. 1990).

Los diversos estudios autorradiográficos y bioquímicos en la edad adulta indican

que muchos receptores opioides están localizados en neuronas que contienen monoaminas por todo el encéfalo. Más concretamente, respecto a nuestro estudio, se han encontrado receptores opioides en neuronas dopaminérgicas estriatales cuyos cuerpos neuronales están localizados en el propio cuerpo estriado (Illes y Jackisch 1991; Murrin y col. 1980) o se encuentran en la *substantia nigra* (Illes y Jackisch 1991; Murrin y col. 1980; Pollard y col. 1977). En relación con esto se ha visto a través de diálisis encefálica *in vivo* en ratas que varios compuestos agonistas sintéticos del receptor  $\kappa$  inhiben la liberación de DA en estriado, mientras que los agonistas del receptor  $\mu$  incrementan la liberación (Illes y Jackisch 1991; Di Chiara e Imperato 1988). Además, en preparaciones de estriado de rata se ha podido observar que los agonistas del receptor  $\delta$  incrementan la DA endógena (Jhamandas y Marien 1987). La dinorfina 1-17 (péptido agonista de receptor  $\kappa$ ) inyectada en la *pars reticulata* de la *substantia nigra* inhibe la liberación de DA en estriado, aunque a altas dosis (pero no a medias o bajas) puede aumentar las concentraciones de DA y DOPAC y, a dosis medias, las de HVA en esta misma estructura, medidas por microdiálisis *in vivo* (Reid y col. 1988). Por otro lado, se ha observado que la dinorfina 1-13 (péptido agonista del receptor  $\kappa$ ) inyectada asimismo en *pars reticulata* de la *substantia nigra* incrementa los niveles de DOPAC en estriado, *in vitro* (Tan y Tsou 1988). La morfina (16mg/Kg) inyectada subcutáneamente también incrementa las concentraciones de DOPAC y HVA en estriado (Kim y col. 1986). Existen estudios electrofisiológicos que indican que la morfina podría actuar sobre las neuronas dopaminérgicas incrementando la frecuencia de disparo en la *pars compacta* de la *substantia nigra*, cuando se administrada vía sistémica (Finnerty y Chan 1981) o iontoforética (Hommer y Pert 1983; Illes y



Jackisch 1991; Jurna 1981). Sin embargo, la dinorfina 1-13 vía iontoforética no tiene efecto (Lavin y García-Muñoz 1985) y el U-504888H (compuesto sintético agonista del receptor  $\kappa$ ) por vía intravenosa deprime la frecuencia de disparo (Walker y col. 1987), ambos en la *pars compacta* de la *substantia nigra*. Sin embargo si la dinorfina 1-13 (vía iontoforética) se administra en la *pars reticulata* de la *substantia nigra*, reduce esta frecuencia en las neuronas (Lavin y García-Muñoz 1985). También se ha encontrado en preparaciones de hipotálamo mediobasal que la  $\beta$ -endorfina inhibe la liberación espontánea de DA (Wilkes y Yen 1980). Este efecto es antagonizado por naloxona (antagonista opioide general), que administrada sola produce elevaciones de DA (Illes y Jackisch 1991; Leadem y col. 1985). Además la administración intraventricular de  $\beta$ -endorfina, morfina [D-Ala<sup>2</sup>]-metionina-enkefalina (agonista opioide sintético) inhiben la liberación de DA por las neuronas tuberoinfundibulares, mientras que el pretratamiento con naloxona evita este efecto (Gudelsky y Porter 1979). Por otra parte, se ha podido observar mediante microdiálisis que la inyección subcutánea de morfina es capaz de aumentar la liberación de serotonina y los niveles extracelulares de 5-HIAA en el diencefalo de la rata (Grauer y col. 1992). Es posible que haya neuronas serotoninérgicas que contengan receptores opioides, puesto que se presume que la antinocicepción inducida por morfina implica la activación de neuronas serotoninérgicas descendentes que se proyectan desde los núcleos del rafe hasta las astas dorsales de la médula espinal (Mayer 1979; Mayer y Price 1976). Así, se ha observado que lesionando el nucleo del rafe mediano o haciendo descender farmacológicamente la síntesis de 5-HT, se atenúa la eficacia de la analgesia por morfina (Baron y col. 1985; Samanin y col. 1970; Tempel y col. 1982). Además, la antinocicepción

producida por inyección de la morfina en la sustancia gris periacueductal se reduce significativamente por administración intratecal de metilsérgido (antagonista de 5-HT), lo que es consistente con el hecho de que la inyección de morfina en la sustancia gris periacueductal produzca liberación de 5-HT en la médula espinal (Baron y col. 1985; Yaksh y Tyce 1979). Se ha descrito que también el efecto analgésico de la D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-encefalina (agonista preferente del receptor  $\delta$ ) se potencia con la inyección de 5-HT y se atenúa con reserpina (fármaco que interfiere con el almacenamiento de las monoaminas). Esta última atenuación puede revertirse por inyección de 5-HT (Baron y col. 1985; Lee y col. 1978). Asimismo, la antinocicepción producida por agonistas sintéticos específicos para el receptor  $\kappa$  se revierte al hacer descender los niveles de 5-HT en el encéfalo y médula espinal por medio de neurotoxinas (Nakazawa y col. 1991).

Dadas las evidentes interacciones entre los dos sistemas a nivel central, parece lógico pensar que el bloqueo del sistema opioide tenga consecuencias sobre los sistemas monoaminérgicos. Así, algunos autores han estudiado los efectos del bloqueo opioide crónico durante ocho días mediante la utilización de implantes subcutáneos de naltrexona (Barón y col. 1985; Sharma y col. 1988). En el primero de los mencionados estudios se midieron los cambios en la concentración de monoaminas y en el segundo se valoraron las tasas de recambio en diversas regiones encefálicas. En ambos trabajos se observaron algunos cambios en los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, aunque, en contra de lo esperado dadas las evidencias anteriores, no fueron capaces de detectar cambios en el cuerpo estriado, hipotálamo y sustancia gris periacueductal.

Son muy pocos los trabajos que aparecen en la literatura que estudien el efecto de los agonistas y antagonistas opioides sobre otros sistemas de neurotransmisión y menos aún durante el desarrollo. Algunos autores han observado que la administración aguda de morfina durante período neonatal temprano en la rata produce una elevación significativa de la concentración de DOPAC una hora y media más tarde. Este efecto era evidente desde el día 6 hasta la edad adulta con un pico en el día 15; sin embargo no se producía al día 3 (Roth y col. 1980). Por lo que se refiere a la administración crónica de antagonistas, en un trabajo anterior en el que se investigaba las repercusiones del bloqueo opioide en ratas de 22 días inyectando naloxona diariamente desde el día 1, no encontraron ningún efecto sobre las concentraciones de dopamina, serotonina o noradrenalina ni en una medición la tasa de recambio (utilizando  $\alpha$ -metiltirosina, inhibidor de la tirosina hidroxilasa) de la dopamina y noradrenalina en ninguna de las regiones encefálicas que examinaron (entre ellas, el cuerpo estriado, mesencéfalo e hipotálamo) (Bardo y col. 1982). Los autores sugirieron que la utilización de un antagonista de mayor duración sí podría producir alteraciones en el desarrollo de los sistemas monoaminérgicos.

*Parece claro que el sistema opioide tiene un papel importante en la regulación de los sistemas monoaminérgicos tanto en el animal adulto como en el neonato, presentando además diferencias en sus acciones a lo largo del desarrollo postnatal que permiten sugerir la existencia de períodos críticos para su actuación. Son relativamente escasos, sin embargo, los trabajos que tienen como objeto los animales neonatales y es aún más patente la escasez de investigaciones que aborden de forma continuada durante el desarrollo el*

estudio dinámico de las interacciones entre el sistema opioide y los sistemas monoaminérgicos utilizando antagonistas opioides. El presente trabajo ha pretendido hacer hincapié en estos aspectos como un modo de clarificar las repercusiones de la plasticidad del sistema opioide durante períodos críticos del desarrollo sobre el funcionamiento de los sistemas monoaminérgicos centrales estrechamente relacionados.

### 1.3 SISTEMA OPIOIDE Y COMPORTAMIENTO

Como ya se mencionó en la sección I.1.1.5 de esta introducción, son muchos los tipos de comportamientos y condiciones psicológicas en las que interviene el sistema opioide endógeno. Sin embargo, en este apartado nos centraremos en su modulación de las relaciones sociales y de las respuestas exploratorias y emocionales, por constituir éstas el objeto directo del presente trabajo.

Existen evidencias experimentales que implican al sistema opioide encefálico en la modulación de las interacciones sociales en los animales jóvenes y en el apego materno-filial (Herman y Panksepp 1978; Panksepp y col. 1978). Se ha encontrado además que, a su vez, el funcionamiento del sistema opioide y la nocicepción pueden verse alterados por el ambiente social en animales neonatales (Alleva y col. 1986; Enters y Spear 1988; Spear y col. 1985). Asimismo, parece que el aislamiento social en ratas de 6 días produce analgesia reversible por naloxona y antagonistas de serotonina (Spear y col. 1985; Enters y Spear 1988). Por otra parte, la  $\beta$ -endorfina parece tener un efecto supresor de la

motivación sociosexual en ratas adultas que puede revertirse por naloxona (Wiesner y col. 1986). Se visto además que la administración de la naloxona en ratas neonatales puede producir una disminución en el juego social (Siegel y Jensen 1986).

Dentro de este contexto, el aislamiento sexual neonatal (mantener a los animales en camadas sólo de machos o sólo de hembras desde el nacimiento) constituye un modelo de modificación de las condiciones sociales de gran interés biológico. Sin embargo, son pocos los trabajos que han utilizado este tratamiento (Alleva y col. 1986; Laviola y Loggi 1992; Sharpe 1975; Van de Poll y col. 1982). De entre ellos, sólo uno ha estudiado la implicación del sistema opioide, encontrando una potenciación del efecto analgésico de la morfina en ratones machos aislados sexualmente de 40 días de edad (Alleva y col. 1986). Es de interés mencionar que el aislamiento sexual también parece afectar a la sensibilidad de los ratones hembra a los efectos antinociceptivos de las benzodiazepinas en la edad adulta, aunque no parece afectar a la nocicepción de los machos (Laviola y Loggi. 1992). Las evidencias encontradas hasta el momento parecen indicar que el aislamiento sexual es una situación de ambiente social que puede producir alteraciones en los sistemas neurales implicados en la modulación del dolor, posiblemente de forma distinta según el sexo. Dada la importante implicación del sistema opioide tanto en la nocicepción como en la modulación de las interacciones sociales, sería previsible que dicho modelo fuera capaz de producir alteraciones en el desarrollo postnatal del sistema opioide y la nocicepción. Esta cuestión ha sido abordada por primera vez en la presente Tesis Doctoral de forma conjunta y en ambos sexos.

Son numerosos los estudios que indican que los péptidos opioides se liberan como parte de una reacción adaptativa durante determinadas situaciones estresantes como por ejemplo en la respuesta al choque eléctrico (Fanselow y Bolles 1979) y en la natación forzada (*prueba de desesperación*) (Katoh y col. 1990; Sunal 1986). En circunstancias de este tipo, se ha visto que los agonistas opiáceos pueden tener efectos similares: se han propuesto efectos *antiemocionales* para la morfina en una prueba de castigo discriminado (Morris y Gebhart 1978). Es más, se ha sugerido que los opioides ejercen una acción facilitadora de la exploración ante ambiente novedoso o adverso (para revisión ver van Abeelen 1989; Fontani y col. 1993). Así, se ha visto que en estas situaciones se produce la liberación de  $\beta$ -endorfina en el encéfalo. Además, la administración de agonistas opioides como morfina o Leu-enkefalina incrementa el comportamiento exploratorio en ambientes novedosos. En concordancia con esto, los antagonistas opioides como naloxona o naltrexona deprimen la actividad locomotora, el atusamiento rostral y la exploración de agujeros en ambientes novedosos (para revisión ver Bardo y col. 1989). Por su parte la deltorfina (agonista del receptor  $\delta$ ) facilita el comportamiento de alerta frente a un depredador en el conejo (Fontani y col. 1993). Asimismo, en los seres humanos adultos se ha encontrado que los compuestos agonistas opioides tienen efectos ansiolíticos, tranquilizantes y posiblemente antidepresivos (para revisión ver Emrich y Schmauss 1991), mientras que la administración de naltrexona puede producir síntomas de tipo depresivo (Emrich y Schmauss 1991; Hollister y col. 1981). Por otra parte, también se ha propuesto una implicación opioide en la respuesta locomotora. Así, se ha descrito que la morfina induce hiperactividad (Hoskins y col. 1986), aunque no se ha encontrado dicho efecto para

la  $\beta$ -endorfina (Puglisi-Allegra y col 1982). Sin embargo, en un trabajo más reciente utilizando agonistas y antagonistas específicos inyectados en el área tegmental ventral se encontró que la activación de los receptores  $\delta$  produce hiperactividad (actímetro y campo abierto cuadrado) e incrementa la exploración (caja de cuatro agujeros), mientras que la activación de los receptores  $\mu$  produce hipoactividad, descenso de la exploración en los mencionados aparatos, e incremento de la ansiedad en el laberinto en cruz (Calenco-Choukroun y col. 1991). Complementariamente, se ha comprobado que la inhibición del catabolismo de las encefalinas en el área tegmental ventral aumenta la actividad general de los animales (Daugé y col. 1992). Otros autores han encontrado un diferente patrón de desplazamiento inducido por agonistas  $\mu$  y  $\delta$  inyectados en los ventrículos laterales: mientras que la activación del receptor  $\mu$  produjo un incremento en la tigmotaxia y redujo la postura erguida, la activación de los  $\delta$  no alteró dichos parámetros y en ambos casos se produjo incremento de la deambulación (Mickley y col 1990). Por contra, cuando se inyectan bilateralmente en la sustancia nigra, los agonistas  $\mu$  producen olisqueo y mordisqueo estereotipado, mientras que los agonistas  $\delta$  incrementan la exploración y postura erguida sin producir mordisqueo (Morelli y col. 1989). Estos diferentes resultados ponen de manifiesto que aún existe discusión sobre los efectos antiemotivos de algunos opiáceos, al menos de los agonistas exógenos del receptor  $\mu$  y en las condiciones de ciertos trabajos, por lo que la discusión seguiría abierta para algunos compuestos específicos. En cualquier caso, la implicación del sistema opioide en los diferentes tipos de comportamiento que venimos comentando parece estar suficientemente probada, aunque la complejidad de algunos resultados hace difícil establecer funciones concretas para los

diferentes componentes del sistema opioide endógeno.

Es menor, sin embargo, el número de trabajos en los que se han investigado las repercusiones de la administración neonatal de sustancias opioides sobre las distintas respuestas emotivas en la edad adulta. En uno de estos pocos estudios, ha podido observarse que la inyección de naltrexona en dosis constante (100 µg/inyección) durante los días 1 al 10 produce el incremento de las pautas exploratorias espontáneas y de la postura erguida en las hembras y una disminución del número de posturas erguidas en los machos (Meyerson y col. 1988). Además, parece que la administración de naltrexona en la bebida de la madre gestante y/o lactante parece facilitar la extinción de la respuesta emocional condicionada en las crías de rata al llegar a la edad adulta (Harry y Rosecrans). Por lo que se refiere a la utilización de agonistas, es de destacar que la administración neonatal de encefalina en la rata tiene un efecto facilitador del comportamiento en un laberinto complejo cuando se les somete a la prueba en la edad adulta (Kastin y col. 1980). Asimismo, la exposición neonatal a metadona hace que las ratas adultas presenten una mayor actividad en diversas pruebas comportamentales (campo abierto, jaula de actividad, rueda de actividad, plataforma elevada) (Zagon y col. 1979). Sin embargo, se ha visto que los tratamientos pre- y postnatal con  $\beta$ -endorfina no influyen significativamente sobre la actividad en el campo abierto cuadrado de la rata adulta (Zadina y col. 1985).

Estos resultados indican que el ambiente opioide neonatal parece ser importante para el establecimiento de las respuestas adaptativas en al edad adulta. Sin embargo, lo



fragmentario de los datos existentes, así como las discrepancias entre los distintos autores dependiente del compuesto opioide empleado y las distintas rutas de administración utilizadas, hacen que no esté claro el papel del sistema opioide neonatal en la regulación de estas funciones.

Es necesario destacar con respecto a este tipo de estudios, que el comportamiento supone el resultado de una integración compleja en la que intervienen diversos niveles del sistema nervioso central responsables de distintos aspectos comportamentales, por lo que la apreciación rigurosa de los cambios comportamentales sólo puede realizarse mediante la utilización de una variedad de pruebas y la medición de pautas que sean suficientemente representativas. La necesidad de un estudio amplio e integrativo de las alteraciones del comportamiento ha sido también expresada recientemente por algunos autores (para discusión ver Kshama y col. 1990). De acuerdo con esta perspectiva, en la presente Tesis Doctoral se ha pretendido aportar una visión integradora de los cambios comportamentales en la edad adulta inducidos por el bloqueo funcional opioide durante períodos críticos del desarrollo, mediante la valoración de una amplia gama de pautas comportamentales. De nuevo, y siguiendo con el hilo conductor de nuestro planteamiento experimental, esta última parte del trabajo supone un enfoque adicional para el estudio de las consecuencias de la plasticidad del sistema opioide: en este caso, sobre el establecimiento de los sistemas reguladores del comportamiento.

#### I.4 PAPEL DEL SISTEMA OPIOIDE EN EL DESARROLLO NEUROBIOLÓGICO Y SOMÁTICO

En los últimos años se ha suscitado un interés creciente por conocer el papel de los opioides sobre el desarrollo somático y neurobiológico, principalmente debido a la preocupación por las consecuencias del abuso de drogas opiáceas (y su terapia) en la madre gestante y/o lactante sobre el feto y neonato humanos (para revisión ver Harry y Rosecrans 1979; Zagon y McLaughlin 1992).

Según los resultados disponibles, los péptidos opioides podrían ejercer un papel regulatorio del crecimiento por medio de mecanismos de inhibición. Su forma de actuación sería, además, a través de un *input* tónico (Zagon y McLaughlin 1992). Las consecuencias del bloqueo opioide parecen depender de si éste es crónico (durante las 24hr del día, dosis altas: 50 mg/kg) o temporal (4-6hr, dosis más bajas: 1mg/Kg). Así, la administración neonatal de naltrexona de forma crónica (50 mg/kg) produce incrementos del desarrollo somático y neurobiológico (Zagon y McLaughlin 1984, 1986ab). Sin embargo, se ha encontrado que el bloqueo opioide temporal inhibe el crecimiento corporal y del encéfalo (Zagon y McLaughlin 1984) así como del cerebelo (Zagon y McLaughlin 1986b). No se han observado estos efectos inyectando a las ratas neonatales con otro antagonista opioide general, la naloxona (1mg/Kg dos inyecciones diarias desde el día 1 de vida), aunque una inyección diaria de morfina a una dosis de 5mg/Kg disminuye los pesos encefálico y corporal a los 22 días de edad (Bardo y col. 1982). También se han estudiado los efectos

de la administración de naltrexona durante la embriogénesis, encontrándose en los animales tratados un mayor número de neuronas y células gliales encargadas de la proliferación, así como de formaciones dendríticas y una sinaptogénesis incrementada (Zagon y McLaughlin 1986b, 1987, 1991; Hauser y col. 1987, 1989; Isayama y col. 1991). Por su parte, la administración de morfina reduce el crecimiento dendrítico basilar en neuronas corticales, lo que resulta consistente con los resultados anteriores (Hammer y col. 1989). Parece que el control de la proliferación celular podría ser también uno de los objetivos de esta función opioide puesto que se ha observado que los opioides endógenos reducirían la mitosis y la síntesis de ADN en células neurales (Vertes y col. 1982; Zagon y McLaughlin 1987, 1991). Además, la administración de morfina al día 1 de edad inhibe la incorporación de timidina tritiada al ADN encefálico en la rata. Este efecto es antagonizado por la naloxona (Loughlin y col. 1985; Kornblum y col. 1987). De forma coherente con lo mencionado anteriormente, en el cerebelo la inmunoreactividad opioide aparece en las células neurales germinales y no en las diferenciadas (Loughlin y col. 1985; Zagon y McLaughlin 1990b). Dicha actividad aparece relacionada con la mayoría de los orgánulos de las células en proliferación (Zagon y McLaughlin 1990b). En relación con estos estudios ha llegado un descubrimiento interesante sobre el propio sistema opioide: la existencia de un receptor con alta afinidad para la met-enkefalina en el interior del núcleo de la célula en desarrollo (el receptor  $\zeta$ ) (Zagon y McLaughlin 1991).

Todas estas evidencias señalan la relevancia del sistema opioide endógeno en la regulación del crecimiento. Resulta, por tanto, de gran interés, dentro del estudio de las

actuaciones del bloqueo opioide sobre el desarrollo, el seguimiento de una serie de parámetros que permitan el control de estos efectos para obtener una visión más global y contrastada de las consecuencias del tratamiento (para discusión ver Wier y col. 1989; Zagon y McLaughlin 1990a). Dado que en el presente trabajo se ha empleado un tratamiento consistente en la administración diaria de naltrexona durante las tres primeras semanas postnatales, pareció conveniente, a la vista de las razones expuestas, realizar el seguimiento de diversas variables relacionadas con el desarrollo somático y neurobiológico durante la aplicación tratamiento y cubriendo todo el período postnatal. Estos datos, además de suponer un control paralelo necesario, pueden contribuir a clarificar el papel del sistema opioide en la regulación de dichas funciones.

## **II. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL**

Una característica especialmente relevante del sistema opioide endógeno parece ser su plasticidad. Sin embargo, han sido menos estudiadas las consecuencias de dicha plasticidad sobre el desarrollo de otros sistemas neuroendocrinos estrechamente relacionados. Es bien conocida la existencia de diversos períodos críticos durante el desarrollo del sistema nervioso, y en este sentido resulta particularmente interesante la posibilidad de períodos críticos en el desarrollo del SOE. Existen relativamente pocos trabajos sobre la influencia de modificaciones en el ambiente social temprano sobre el ulterior funcionamiento del sistema opioide. Por otra parte, diversos estudios indican que la exposición a agonistas y antagonistas opioides influye en el establecimiento de los mecanismos nerviosos centrales implicados en diversos procesos fisiológicos y comportamentales. Sin embargo, los datos relativos a alteraciones permanentes o de larga duración sobre el comportamiento son hasta el momento fragmentarios.

A la vista de los resultados previos obtenidos por otros autores, ya expuestos en el apartado I de la presente Tesis Doctoral, nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente: la plasticidad del sistema opioide debe manifestarse en la existencia de períodos críticos durante el desarrollo del receptor  $\mu$  en los que dicho receptor resulta especialmente vulnerable a los tratamientos de tipo social y farmacológico. Además, el bloqueo funcional del SOE durante tales etapas críticas debe afectar al funcionamiento de los sistemas monoaminérgicos centrales y al establecimiento de las respuestas comportamentales adaptativas en el animal adulto. Así pues, el objetivo del presente trabajo ha sido determinar las edades que pueden ser críticas durante el desarrollo del receptor  $\mu$  y estudiar

las consecuencias de la plasticidad de dicho receptor sobre otros sistemas neuroquímicos y comportamentales estrechamente relacionados, todo ello en ratas de ambos sexos. En concreto, se ha planteado el estudio de los efectos de diversos tratamientos neonatales de carácter tanto ambiental (aislamiento sexual) como farmacológico (bloqueo funcional del SOE mediante antagonistas) sobre el desarrollo del receptor  $\mu$  en encéfalo entero, sistemas monoaminérgicos en diversas áreas encefálicas y una amplia gama de pautas comportamentales que reflejan los niveles de ansiedad, emotividad y capacidad exploratoria de los individuos. Paralelamente, se ha realizado el seguimiento a lo largo del período experimental de una serie de parámetros bioquímicos, comportamentales y de crecimiento indicativos de los efectos que los tratamientos utilizados podrían tener sobre el desarrollo neurobiológico de los animales.

La elección del aislamiento sexual como tratamiento ambiental obedece a que, a pesar de ser éste un modelo de especial significación biológica, ha sido escasamente utilizado, especialmente en cuanto a sus efectos sobre el SOE; de hecho, este trabajo es el primero en abordar el estudio de la influencia del aislamiento sexual sobre el desarrollo del receptor  $\mu$  en ratas de ambos sexos.

Como ya se ha indicado en la *Introducción*, el receptor  $\mu$  parece ser particularmente sensible y desempeñar un papel significativo durante el desarrollo neonatal. Por esta razón, y con objeto de obtener información adicional sobre posibles períodos críticos en el desarrollo del SOE, se eligió un antagonista selectivo para dicho receptor -la  $\beta$ -FNA- en

la siguiente fase experimental. Las características de su unión irreversible al receptor nos han permitido estudiar los efectos de una administración única del fármaco sobre el desarrollo del propio receptor opioide durante las dos primeras semanas de vida, período durante el que encontramos los efectos más marcados del aislamiento sexual. Paralelamente, se evaluaron los efectos de ambos tratamientos sobre el desarrollo de respuestas nociceptivas a diferentes estímulos.

Las estrechas relaciones existentes entre el SOE y los sistemas monoaminérgicos encefálicos nos llevaron a elegir dichos sistemas para el estudio de las relaciones neuroquímicas. En este caso, se realizó un seguimiento continuado de los efectos de la administración de naltrexona durante el período predestete sobre el desarrollo de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico. Este planteamiento ha permitido una visión más dinámica de las interacciones entre ambos sistemas, estudiándose además la inercia de los efectos del tratamiento mediante valoraciones de aminas biógenas también en la edad adulta.

Como se indica al principio de este apartado, los datos referentes a los efectos que los tratamientos farmacológicos de tipo opioide durante el desarrollo tienen sobre el comportamiento en edad adulta son hasta ahora fragmentarios. Por esta razón, se planteó una batería de pruebas comportamentales que incluye el tablero de agujeros, el laberinto en cruz y el campo abierto, y el registro de una amplia gama de parámetros que nos han permitido obtener un cuadro suficientemente amplio y coherente de las consecuencias



comportamentales objeto de nuestro estudio. Para esta última aproximación experimental se eligió el mismo tratamiento neonatal con el antagonista opioide inespecífico naltrexona, utilizado para el estudio de las relaciones neuroquímicas. Esto, a su vez, nos ha permitido establecer algunos paralelismos o relaciones interesantes entre las alteraciones comportamentales y neuroquímicas encontradas.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### III.1 ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

Los 928 animales empleados en esta Tesis Doctoral fueron siempre ratas (*Ratus norvegicus*) albinas, de ambos sexos, de la variedad *Wistar*. Los experimentos en los que se llevó a cabo valoración de receptores y nocicepción (apartados III.2 y IV.1) se realizaron en la Universidad de Surrey (Reino Unido), mientras que el resto de los experimentos tuvieron lugar en la Universidad Complutense de Madrid, razón por la cual existieron algunas diferencias referentes a este apartado. Así, las ratas empleadas para receptores y nocicepción fueron ratas *Wistar* de la cepa *University of Surrey* (Guildford, Reino Unido) y se mantuvieron en un ciclo de 12hr luz/oscuridad, comenzando la fase lumínica a las 07:00hr. Los diversos procedimientos experimentales con dichos animales se llevaron a cabo entre las 08:30 y las 11:30hr. Los animales correspondientes al resto de las investigaciones fueron ratas procedentes de la colonia primaria de ratas *Wistar* del IFFA-CREDO (*Institut Français de la Fièvre Aphteuse-Centre de Recherche et d' Elevage du Domain des Oncins*, Les Oncins, Francia). Estos animales estuvieron sometidos a un ciclo de luz invertido 12hr oscuridad/luz, empezando la fase luminosa a las 20:00hr. La fase de mayor actividad en la rata es precisamente la noche, por esta razón y con el fin de poder hacer las mediciones comportamentales previstas en el período del día más adecuado para ello, se emplearon las condiciones de ciclo luz inverso para esta parte de la Tesis Doctoral. En este caso, los estudios comportamentales, así como las diversas manipulaciones experimentales de estos animales, se realizaron entre las 09:30 y las 14:30hr.

En todos los casos, los animales se mantuvieron a una temperatura constante ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y tuvieron libre acceso a la comida (pienso compuesto) y al agua en todo momento, y fueron alojados en jaulas de material plástico cubiertas por una rejilla metálica. El fondo de la jaula fue cubierto con viruta higienizada. Todos los animales utilizados en los experimentos nacieron ya en las condiciones anteriormente descritas para cada caso, y desde entonces fueron controlados por nosotros hasta su sacrificio. Las camadas se homogeneizaron al día de nacimiento (intercambiando animales de distintas madres, cuando fue posible) dejándolas en un número de  $10\pm 1$  crías por madre, en cuya sola compañía permanecieron hasta el destete. Además, salvo en el caso de los estudios sobre aislamiento sexual (ver sección III.2.1.1), se hizo que las camadas estuvieran equilibradas en cuanto al número de animales de cada sexo. Todo ello se hizo con el fin de evitar las posibles consecuencias comportamentales o neurofisiológicas que pudieran derivarse de una distinta composición sexual de la camada (objeto de estudio de la primera parte de la Tesis, ver apartados III.2 y IV.1) y de su distinto tamaño, así como las presumibles variaciones en el peso corporal debidas a las distintas condiciones nutricionales (Viveros 1985, Tesis Doctoral). El destete se realizó, en su caso, a los 22 días de edad, considerando el día de nacimiento como *día 0*. Tras el destete los animales se alojaron en número de  $5\pm 1$  individuos, del mismo sexo, por jaula. La obtención de los pesos corporales y la inyección de los animales se hizo siempre en una habitación contigua a la cual se alojaban de forma habitual y que reunía las mismas condiciones de luz y temperatura y carecía también de ventanas, de forma que no hubiera solución de continuidad en cuanto a las mismas, evitando el estrés que de otra forma hubiera podido

producirse en el traslado. Previamente a la realización de los experimentos, se permitió que los animales se habituaran al laboratorio donde tendrían lugar, que se encontraba bajo las mismas condiciones de luz y temperatura del animalario. Además, estaba insonorizado frente al exterior con doble puerta, sin ventanas y estaba dotado de una fuente de ruido continuo y monótono para amortiguar los que pudieran producirse durante la experimentación (o posibles filtraciones del exterior) y que podrían alterar a los animales. Las crías antes del destete permanecieron con la madre en todo momento excepto durante el procedimiento experimental, con efecto de minimizar el estrés debido a la separación de la madre. Para prevenir el efecto de las diferencias entre camadas se dispuso que los grupos experimentales estuvieran formados por animales procedentes de al menos dos camadas distintas con el mismo tratamiento.

Se ha señalado en diversos estudios que durante el período perinatal incluso una manipulación suave puede producir por sí misma reacciones de estrés tales como la estimulación aguda de las glándulas adrenales y cambios en sus respuesta emocionales (para revisión ver por ejemplo Denenberg y Zarrow 1971; Gray 1971ab, 1991). Sin embargo, los efectos de la manipulación no eran el objetivo principal de este estudio, y puesto que las interacciones del estrés por manipulación con los tratamientos empleados no son medibles (no se puede tratar a un animal sin manipularlo de alguna forma; en nuestro estudio, no es posible, por ejemplo, tener ratas con los fármacos administrados y sin inyección). los animales empleados en cada caso como controles son necesariamente los adecuados para discernir los efectos de cada tratamiento, por lo que no se incluyeron

grupos *no manipulados* (para discusión ver Zadina y col. 1985).

## III.2 VALORACIÓN DE LOS RECEPTORES Y NOCICEPCIÓN

### III.2.1 EFECTOS DEL AISLAMIENTO SEXUAL

#### III.2.1.1 Aislamiento sexual

El tratamiento de aislamiento sexual se llevó a cabo manteniendo a los animales desde el nacimiento en camadas con sólo animales del mismo sexo. Para ello, el mismo día de su nacimiento se separaron los hermanos de las hermanas de una misma camada, y se completó el número de animales del mismo sexo hasta  $10 \pm 1$  con crías procedentes de otra camada nacida al mismo tiempo. Las camadas con sólo machos y sólo hembras se alojaron en habitaciones separadas y sin comunicación para asegurar el aislamiento olfativo. Con este mismo fin, tanto los sacos de pienso, como los de viruta empleada para cubrir el suelo de las jaulas, se almacenaron en distintos compartimentos de la Unidad Animal. El llenado de los biberones con agua también se hizo separadamente, y estos nunca se intercambiaron entre los distintos grupos experimentales. Paralelamente, otras camadas con un número equilibrado de machos y hembras (siempre con  $10 \pm 1$  animales por camada) se mantuvieron como controles, en una tercera habitación separada igualmente de las anteriores.

III.2.1.2 Valoración de los receptores  $\mu$ : ensayos de unión de ligando a receptor *in vitro*

Los animales empleados para estos ensayos fueron sacrificados por decapitación a los 7, 14, 23, 45 y 60 días de edad, sin haber sido sometidos a ningún tipo de prueba con anterioridad. A continuación se procedió a cortar en sentido postero-anterior la piel de la cabeza, separándola del cráneo y se practicó la craneotomía introduciendo las tijeras por el *foramen magnum* y cortando desde el hueso occipital hasta el frontal por ambos lados del cráneo. Se separó la bóveda craneana y se extrajo la masa encefálica por medio de una espátula, depositándola en un vaso de precipitado con tampón hidroccloruro de tris-[hidroximetil]-metilamina (TRIS-HCl, *Analar Biochemical n° 10315*) 50 mM mantenido en frío con hielo. Se emplearon entre 2 y 5 encéfalos enteros para cada experimento de saturación. A partir de ellos, y tras ser pesados, se prepararon los homogenados de membranas celulares frescos para cada valoración según el método de Gillan y Kosterlitz de 1982. Brevemente, los encéfalos se homogeneizaron en tampón TRIS-HCl pH 7,4 utilizando un homogeneizador *Polytron (Kinematica)* (45 seg.) y se centrifugaron a 25000 r.p.m. (49000 g) en una ultracentrifugadora *Beckman* (modelo *L5-65B*) durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en el tampón TRIS-HCL y se incubó a 37°C durante 45 min. en un baño de agitación. Esta incubación elimina el ligando endógeno que pudiera estar unido al receptor. Posteriormente, el homogenado se volvió a centrifugar 15 min. a 49000 g. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en el tampón TRIS-HCl y se llevó hasta el volumen correspondiente a una concentración

de 10mg tejido/ml homogenado. De este homogenado se tomó una alícuota para la valoración del contenido de proteínas (ver la sección siguiente III.2.1.3).

Se utilizó D-Ala<sup>2</sup>-Mephe<sup>4</sup>Gly-ol<sup>5</sup>-[tyrosil-3,5-<sup>3</sup>H] encefalina (DAMGO) (*Amersham International plc., cód. TRK.681*) como ligando marcado específico para el receptor  $\mu$ . Este compuesto fue purificado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa, eluido con un gradiente lineal de acetonitrilo (15-30% durante 30 min. a 1ml/min. en 6,25 v/v ácido acético glacial/0,25 v/v amoníaco, pH 3,2). En esta serie de experimentos se llevaron a cabo estudios de saturación siguiendo la técnica descrita por Yeadon y Kitchen en 1988. Para ello, se incubó el homogenado preparado en TRIS-HCl, pH 7,4, en un baño de agitación (a 25°C durante 45 min.) con concentraciones crecientes de [<sup>3</sup>H] DAMGO (12 concentraciones, entorno a un rango comprendido entre 0,035 y 9,000 nM) y por triplicado, en presencia y ausencia de diprenorfina fría 1 $\mu$ M (*Reckitt, M 5050*). Esta concentración de diprenorfina es saturante para todos los receptores opioides, y se emplea como desplazante para determinar la unión inespecífica. La reacción de unión del ligando al receptor se detuvo por filtración sobre filtros *Whatman GF/B* utilizando un recolector de muestras *BRANDEL* (modelo 24R) conectado a una bomba de vacío *Millipore* (modelo xx55 220 50), previamente humedecidos con tampón TRIS-HCl, pH 7,4. Los filtros fueron lavados con tampón TRIS-HCl para eliminar el ligando no unido, tras lo cual fueron dispuestos en viales a los que se añadió el correspondiente líquido de centelleo (*Unisolve E, KOCK-LIGHT Ltd.*) junto con una solución tritón-100/tolueno al 20% v/v, como disolvente. La radioactividad se midió al menos 12 hr. más tarde (para permitir la



estabilización de la reacción de centelleo) por contaje de centelleo líquido en un contador  $\beta$  (*LKB 1215 Rackbeta II*), y la eficacia del contaje se determinó utilizando como estandar [ $^3\text{H}$ ] hexadecano (*Amersham International plc., TRK. 681*). La unión específica se consideró como la diferencia entre la unión total observada y la inespecífica obtenida en presencia del desplazante (diprenorfina). Se utilizó el análisis de Scatchard para determinar la constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) y la capacidad de unión máxima ( $B_{\text{max}}$ ). Los valores de la  $B_{\text{max}}$  se calcularon por peso fresco de tejido y por mg de proteínas tras valorar las concentraciones de proteínas en los homogenados de encéfalo. Se realizaron entre 3-4 ensayos por edad y grupo experimental.

### III.2.1.3 Determinación de la concentración de proteínas en el homogenado

Las valoraciones del contenido de proteínas en las membranas celulares del encéfalo completo se hicieron en alícuotas del homogenado preparado para el ensayo de unión de ligando a receptor, según se describió en la sección anterior (III.2.1.1). Para su determinación se utilizó la técnica colorimétrica descrita por Lowry y colaboradores en 1951, basada en la formación de un complejo Cu-proteína en solución alcalina; posteriormente este complejo reduce al reactivo de fosfomolibdato-fosfotungstato, produciendo un color azul intenso.

Para esta valoración son necesarios los siguientes reactivos:

- Reactivo A:  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2% p/v en NaOH 0,1 M
- Reactivo B: se prepara mezclando en el momento de su utilización las siguientes soluciones en proporción 1:1 v/v:

$\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1% en agua destilada

$\text{C}_4\text{H}_4\text{NaK}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 2% en agua destilada

- Reactivo C: 49ml de reactivo A + 1ml de reactivo B; también debe prepararse fresco para su utilización.
- Reactivo de Folin-Ciocalteus: diluido en agua destilada en una proporción 1:1. Se prepara cada vez para su uso.

Se tomaron muestras de 0,5ml de homogenado por triplicado y se les añadieron 2,5ml de reactivo C. Se dejaron reposar durante 10 min. A continuación, se añadieron 0,25ml del reactivo de Folin diluido. Se agitaron inmediatamente y se dejaron reposar 30 min. El blanco se preparó con tampón TRIS-HCl. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 690nm en un espectrofotómetro *CECIL* (modelo *CE303*).

La estimación de la concentración de proteínas se hizo interpolando los valores en una curva patrón (6 concentraciones, en un rango de 50-500  $\mu\text{g/ml}$ ) de albúmina sérica

bovina (*Sigma A-4503*) por medio de un análisis de regresión lineal. Se empleó el valor del peso fresco de los encéfalos correspondientes a cada muestra para expresar la concentración por mg de tejido.

#### III.2.1.4 Pruebas nociceptivas

Las respuestas nociceptivas basales se midieron en los animales a las edades de 7, 14, 23, 45 y 60 días, mediante dos tipos de pruebas:

##### \*Prueba de inmersión de la cola en agua caliente (tail immersion)

Esta prueba se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Kitchen y colaboradores en 1984. Se tomó cada animal individualmente sujetándolo por el cuerpo en posición vertical. Una vez que el animal se encuentra calmado y con la cola relajada y recta, se sumerge aproximadamente el último tercio de ésta (por ser la zona más sensible) en el agua de un baño con la temperatura regulada a 50°C. Las latencias para esta prueba se midieron (utilizando un cronómetro manual) como el tiempo transcurrido hasta la retirada de la cola de la superficie del agua (Fig. 3a). Se estableció un tiempo máximo de 10 segundos transcurrido el cual se daría la prueba por finalizada, con el fin de evitar el daño tisular. Si un animal llega a dicho límite sin responder, se elimina del estudio.

\*Prueba de presión de la pata (*paw-pressure*)

Para la realización de esta prueba fue necesaria una modificación del modelo comercial existente de *Analgesímetro* (*Ugo Basile*, Milán) empleado para la prueba de Radall y Sellito (1957), y que básicamente representa la sustitución del terminal puntiagudo por una barra cilíndrica situada de forma horizontal para presionar la pata (Kitchen 1984). Esta modificación asegura que el animal reciba un auténtico estímulo de *presión* como tal, al tiempo que evita causar un posible daño a la pata, especialmente en el animal neonato, y permite un fácil escape del estímulo nociceptivo. La prueba consiste en situar la pata trasera del animal bajo la barra cilíndrica del aparato, y, cuando el animal está tranquilo (Fig. 3b), se comienza a añadir peso sobre la barra a través de un dispositivo que se acciona mediante un pedal, y puede seguirse su progresión en todo momento a través de un puntero sobre una escala lineal. El peso al que el animal retira la pata (o sacude el cuerpo hacia atrás) se considera como el umbral nociceptivo. Se establecieron los límites máximos de peso adecuados según la edad de los animales: 250g hasta los 30 días, 750g para los de 45 y 60 días de edad. Cada valor utilizado para el análisis estadístico representa la media de los resultados obtenidos para ambas patas traseras. En el caso de que un animal no presente respuesta para ninguna de las dos patas, es excluido del estudio. Si sólo deja de responder en una de ellas, a ésta se le asigna el límite máximo y se halla igualmente la media.

La prueba de presión se realizó inmediatamente a continuación de la prueba de

a)



b)



FIG. 3. Pruebas nociceptivas empleadas: a) inmersión de la cola en agua caliente; b) presión de la pata (adaptación del aparato para neonatos)

estímulo térmico. Se hicieron en este orden por ser más sensible la prueba de inmersión de la cola al posible estado de agitación del animal. El número de individuos empleado para cada prueba estuvo entre 6 y 15 por edad y grupo experimental. Nunca se utilizaron los animales de los experimentos de nocicepción para el ensayo de receptores.

#### III.2.1.5 Grupos experimentales

En cada una de las edades estudiadas (7, 14, 23, 45 y 60 días), y de acuerdo con el tratamiento de aislamiento sexual descrito en la sección III.2.1.1, se establecieron los siguientes grupos experimentales:

a) Grupos alojados  
conjuntamente

♂ CONJUN: machos mantenidos desde el nacimiento en camadas con animales de los dos sexos

♀ CONJUN: hembras mantenidas desde el nacimiento en camadas con animales de los dos sexos

b) Grupos aislados  
sexualmente

♂ AISEX: machos mantenidos desde el nacimiento en camadas de sólo machos

♀ AISEX: hembras mantenidas desde el nacimiento en camadas de sólo hembras

### III.2.2 EFECTOS DEL AISLAMIENTO SEXUAL Y LA $\beta$ -FNA

#### III.2.2.1 Aislamiento sexual y tratamiento farmacológico

El aislamiento sexual se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la sección III.2.1.1.

Para el tratamiento farmacológico se utilizó un compuesto de reciente aparición, la  $\beta$ -funaltrexamina ( $\beta$ -FNA), donada generosamente por el Dr. P. Birch (GLAXO- Reino Unido). Este compuesto es un derivado metil-fumarato-éster de la *naltrexona*, (para detalles sobre la *naltrexona* ver sección III.3.1), y esta considerado como antagonista irreversible específico para el receptor  $\mu$  (Ward y col. 1982ab). Tanto la  $\beta$ -FNA (a una dosis de

5mg/Kg) como su vehículo (agua destilada) fueron administrados subcutáneamente a los animales aislados sexualmente y a los alojados conjuntamente en el día de su nacimiento o a los 7 días, en un volumen de dosis de 2,5ml/Kg, utilizando una aguja *microlance* (*Becton Dickinson*, n° 26) ajustada a una jeringa *Hamilton* de 100 $\mu$ l acoplada a un soporte fijo. Siete días más tarde (es decir al día 7 ó día 14) las crías fueron sometidas a la prueba nociceptiva de inmersión de la cola o sacrificadas para el ensayo de receptores *in vitro* (ver secciones siguientes). Este rango de edades se eligió basándonos en los estudios anteriores realizados para esta Tesis Doctoral en los que se observó que dichos parámetros eran más sensibles durante las dos primeras semanas de vida postnatal (ver el apartado IV.1.1). La dosis se adoptó de un estudio anterior en ratas neonatales (Zagon y McLaughlin 1986a). Para verificar si estas dosis y vía de administración eran adecuadas para alcanzar el encéfalo de forma significativa en animales de estas edades, se midió la capacidad de unión al receptor  $\mu$  en un grupo separado de animales 24hr tras la inyección con  $\beta$ -FNA (al día 1 y al día 8).

#### III.2.2.2 Valoración de los receptores $\mu$ : ensayos de unión de ligando a receptor *in vitro*

Para las determinaciones en los animales en los días 7 y 14, así como a los 8 días, se llevaron a cabo estudios de saturación del modo descrito en la sección III.2.1.1, calculándose también tanto la unión máxima ( $B_{max}$ ) como la constante de disociación en el equilibrio ( $K_d$ ) mediante análisis de Scatchard. Para los animales de un día de edad sólo



se midió la densidad de la unión al receptor  $\mu$  usando una sólo concentración de [ $^3\text{H}$ ] DAMGO (6nM) correspondiente a una concentración saturante del ligando; el bajo número de receptores a esta edad impide obtener análisis de regresión fiables. Un método similar ha sido utilizado previamente en otro trabajo (Pasternak y col. 1980). Se emplearon entre 3-7 encéfalos para cada estimación de la densidad de unión. Los valores de la unión a los sitios  $\mu$  en todos los casos se expresaron por peso de tejido y fresco y por mg de proteína. Para cada grupo experimental se realizaron 3-4 ensayos.

#### III.2.2.3 Determinación de la concentración de proteínas en el homogenado

La concentración de las proteínas de las membranas celulares en los homogenados preparados para los ensayos de unión de ligando a receptor se valoraron por el método de Lowry (1951) tal como se describió en la sección III.2.1.2.

#### III.2.2.4 Pruebas nociceptivas

En este segundo estudio se empleó la prueba de inmersión de la cola en agua caliente descrita en la sección III.2.1.4, por ser la que mostró mayor sensibilidad al tratamiento y cierta coherencia con los resultados obtenidos para los receptores al día 14 en el primer trabajo de esta Tesis (ver el apartado IV.1.1).

Aunque el uso de una temperatura del agua fija para todas las edades era

conveniente en un primer momento para mostrar una visión clara del desarrollo de la respuesta a la prueba, la rápida respuesta de las ratas más jóvenes hace que la prueba no permita detectar perfectamente algunos posibles efectos de los tratamientos. Por ello, en esta segunda parte del trabajo decidimos ajustar las condiciones de la prueba de inmersión de la cola para las edades objeto de estudio. Así, en este caso la temperatura del agua que se estableció para la prueba a los 7 días fue de 43,5 °C y de 47,5 °C para los animales de 14 días. El número de animales fue 10-20 por grupo experimental.

#### III.2.2.5 Grupos experimentales

Los grupos experimentales, tanto en los animales inyectados al nacimiento y probados a los 7 días como en los inyectados al día 7 y probados a los 14 días, fueron (ver páginas siguientes):

a) Animales alojados  
conjuntamente

♂ CONJUN VCLO: machos mantenidos desde el nacimiento en camadas con animales de los dos sexos e inyectados con vehículo

♀ CONJUN VCLO: hembras mantenidas desde el nacimiento en camadas con animales de los dos sexos e inyectadas con vehículo

♂ CONJUN FNA: machos mantenidos desde el nacimiento en camadas con animales de los dos sexos e inyectados con  $\beta$ -FNA

♀ CONJUN FNA: hembras mantenidas desde el nacimiento en camadas con animales de los dos sexos e inyectadas con  $\beta$ -FNA

b) Animales aislados  
sexualmente

♂ AISEX VCLO: machos mantenidos desde el nacimiento en camadas de sólo machos e inyectados con vehículo

♀ AISEX VCLO: hembras mantenidas desde el nacimiento en camadas de sólo hembras e inyectadas con vehículo

♂ AISEX FNA: machos mantenidos desde el nacimiento en camadas de sólo machos e inyectados con  $\beta$ -FNA

♀ AISEX FNA: hembras mantenidas desde el nacimiento en camadas de sólo hembras e inyectadas con  $\beta$ -FNA

Por lo que se refiere al grupo de animales a los que se inyectó con  $\beta$ -FNA o vehículo al nacimiento o al día 7 y fueron probados 24hr más tarde (es decir al día 1 y al día 8, respectivamente), los grupos experimentales fueron los siguientes:

a) Grupos controles

♂ VCLO: machos inyectados con vehículo

♀ VCLO: hembras inyectadas con vehículo

b) Grupos inyectados  
con  $\beta$ -FNA

♂ FNA: machos inyectados con  $\beta$ -FNA

♀ FNA: hembras inyectadas con  $\beta$ -FNA

### III.3 INTERACCIONES SOE - SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS

#### III.3.1 TRATAMIENTO CON NALTREXONA

Para esta serie de experimentos se utilizó el hidrocloreuro de naltrexona (NALTX) de la casa *SIGMA* (N-3136), que es un compuesto antagonista opioide de carácter general. Los animales recibieron una inyección diaria de NALTX (1mg/Kg) o de vehículo (agua destilada), subcutáneamente y en un volumen de 1ml/Kg, desde su nacimiento -Día 0- hasta el día anterior a su sacrificio (en el caso de los animales estudiados a los 7, 14 y 22 días) o hasta los 21 días de edad (en los animales analizados en la edad adulta). No se les inyectó en ningún caso el mismo día que fueron sacrificados con el fin de descartar que el efecto observado se debiera sólo a la última inyección y no a la inercia del tratamiento, que es lo que se pretende estudiar. Los animales adultos fueron sacrificados cinco días después de realizar la última prueba comportamental, a fin de permitir su recuperación. También en este caso, al igual que se describió en el apartado III.2.2.1, se empleó una jeringuilla *Hamilton* sujeta en un soporte (con una aguja de insulina *ICO*) para la administración del fármaco o de su vehículo.

La dosis empleada produce un bloqueo funcional del sistema opioide durante 4-6 horas (Zagon y McLaughlin 1984, 1992) cada día en que es administrada. Por ello, y al ser inyectada diariamente consideramos nuestro tratamiento como *subcrónico*.

### III.3.2 DISECCIÓN DE LAS REGIONES ENCEFÁLICAS

Tras sacrificar al animal por decapitación, se procedió a cortar en sentido postero-anterior la piel de la cabeza y separarla del cráneo . Posteriormente se practicó la craneotomía introduciendo las tijeras por el *foramen magnum* y cortando desde el hueso occipital hasta el frontal por ambos lados del cráneo. Después de separar la bóveda craneana se obtuvo la masa encefálica por medio de una espátula, depositándola sobre una placa Petri rellena de hielo. En primer lugar se separó el cerebelo seccionando los pedúnculos cerebelosos (para analizar su contenido de ADN y proteínas, ver sección III.5.1). A continuación se realizó la disección del cuerpo estriado, mesencéfalo, e hipotálamo -utilizando bisturí y pinzas curvas- basándonos en el método de Glowinski e Iversen descrito en 1966. En breve, se separaron los hemisferios cerebrales cortando el cuerpo caloso, y se procedió a la extracción por pinzamiento del cuerpo estriado derecho e izquierdo, tomando como límite interno las paredes externas de los ventrículos laterales y como límite externo el cuerpo caloso. El mesencéfalo se obtuvo haciendo una sección transversal con el bisturí anterior a los tubérculos cuadrigéminos y otra segunda anterior al puente-bulbo raquídeo. Desde la cara ventral del encéfalo, se diseccionó el hipotálamo haciendo dos secciones transversales, la rostral a nivel del quiasma óptico y la caudal anterior al puente-bulbo raquídeo y posterior a los cuerpos mamilares. Para dar límite dorsal al hipotálamo se tomó como referencia la comisura anterior. Finalmente, se delimitó lateralmente mediante secciones parasagitales hechas al límite del giro dentado y los pedúnculos cerebrales.

Todas las estructuras fueron congeladas en nieve carbónica inmediatamente tras su extracción (a excepción del cerebelo, ver sección III.5.1), y trasladadas así a un congelador (*Revco*) de  $-80^{\circ}\text{C}$ , donde permanecieron hasta su posterior procesamiento. El tiempo transcurrido desde la decapitación hasta el congelamiento de la última región encefálica extraída nunca fue superior a 4 min.

### III.3.3 VALORACIÓN DE LAS AMINAS BIÓGENAS POR HPLC

Las distintas estructuras encefálicas se pesaron en una balanza de precisión digital (*Mettler H64*) y se homogeneizaron en tubos *Eppendorf* utilizando un homogeneizador de ultrasonidos (*Labsonic U*). Esta homogeneización se realizó en una solución 0,4 M de  $\text{HClO}_4$  que contenía  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  al 0,1% con una dilución 3 $\mu\text{l}$ /mg de tejido. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm (20.000 g) durante 20 min. a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrifugadora *Sorwall RC-5B* (*Du Pont Instruments*). Los tubos se decantaron y los sobrenadantes se conservaron en un congelador (*Revco*) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Del sobrenadante se tomaron alícuotas para la medición del neurotransmisor serotonina o 5-hidroxi-triptamina (5-HT), y su metabolito de degradación 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA). Para el análisis del neurotransmisor dopamina (DA), y sus metabolitos de degradación ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA), se diluyó previamente la correspondiente alícuota en una proporción 1:2. La valoración de los neurotransmisores y sus correspondientes metabolitos se realizó por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica.



La composición de la fase móvil para DA, DOPAC y HVA empleada fue: hidrogenofosfato de disodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) dihidratado 0,1 M (*Merck n° 6580*), ácido cítrico 0,1 M (pH=4,5) (*Probus n° 11510*), ácido octanosulfónico (PIC) 1 mM (*Sigma Chem. Co. O-7877*) y metanol al 10% v/v (*Scharlau n°301*), a un pH=3,45. La adición de PIC como formador de par iónico es imprescindible para la detección de catecolaminas, ya que aumenta su tiempo de retención impidiendo que eluyan en el frente de inyección. La fase móvil para 5-Ht y 5-HIAA fue la misma que la anteriormente descrita pero sin ácido octanosulfónico, también a un pH=3,45. El agua desionizada empleada para la preparación de la fase móvil se procesó mediante un sistema *Milli-Q (Waters)*, adosado a un sistema de purificación *Milli-RO (Waters)*. Una vez disueltos los componentes, la fase móvil se filtró por medio de vacío a través de un filtro (*Millipore HATF04700*) de un tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ . El filtrado se degasificó al vacío durante 20 min. antes de pasarlo por el cromatógrafo. La elución se realizó con flujo de 1ml/min. a una presión de 2000psi y se fijó una diferencia de potencial 0,8 para DA, DOPAC, HVA y de 0,7 para 5-HT y 5-HIAA entre el electrodo de trabajo (pasta vitrea de carbono) y el de referencia (Ag/AgCl).

La calibración del sistema se efectuó por inyección del estándar externo correspondiente y la realización de una curva de calibrado. Para la evaluación de las indolalquilaminas se prepararon diluciones de 8ng de 5-hidroxitriptamina (*Sigma H-7752*) y 4ng de ácido 5-hidroxiindol-3-acético (*Sigma H-8876*), y para la de las catecolaminas, de 6ng de 3-hidroxitiramina (*Sigma H-8502*), 6ng de ácido 3,4-dihidroxifenilacético (*Sigma D-9128*) y 12ng de ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (*Sigma H-1252*), en una solución

de ácido perclórico 0,4 M y disulfito sódico al 0,1%. Éstas se mezclaron y, diluídas tres veces a la mitad, dieron lugar a cuatro soluciones que conformaban la curva de calibrado.

El sistema cromatográfico consistió en una bomba (*Waters 510*) unido a un inyector de muestras automático (*Waters 712 WISP*) con un volumen de inyección de 20µl, una columna de fase reversa de acero inoxidable (*resolve C18, Waters*) de 15cm de longitud x 3,4mm de diámetro interno y un relleno de 5µl, con una precolumna (*Guard-pack C18 Resolve, Waters*). Se empleó un detector electroquímico de tipo amperimétrico (*Waters 460*) y la corriente producida se controló utilizando un integrador *Waters M745*. Los resultados fueron recogidos por un integrador-registrador *Waters Data Module-745*.

En todas las regiones se valoraron 5-HT y 5-HIAA. En el cuerpo estriado se midieron además DA, DOPAC y HVA. Estas valoraciones se hicieron en paralelo para los grupos tratados y controles, machos y hembras. Con los datos de las concentraciones de los neurotransmisores y de sus metabolitos respectivos se calcularon los cocientes [metabolito]/[neurotransmisor] -DOPAC/DA, HVA/DA y 5-HIAA/5-HT- como posible estimación de la *tasa* o *índice de recambio*, que nos da una indicación sobre la utilización del neurotransmisor (DA ó 5-HT).

### III.3.4 GRUPOS EXPERIMENTALES

Para cada una de las edades 7, 14 y 22 días, y según el tratamiento con naltrexona

descrito en la sección III.3.1 de este mismo apartado, se establecieron los grupos experimentales siguientes:

a) Grupos controles	♂ CONTR: machos inyectados diariamente con vehículo
	♀ CONTR: hembras inyectadas diariamente con vehículo
b) Grupos tratados con naltrexona	♂ NALTX: machos inyectados diariamente con naltrexona
	♀ NALTX: hembras inyectadas diariamente con naltrexona

con un número de individuos entre 9 y 12 por grupo experimental.

Con el fin de comprobar la posible inercia del tratamiento se realizaron, asimismo, valoraciones de monoaminas en las mismas regiones encefálicas indicadas anteriormente, en animales adultos machos. A esta edad se decidió trabajar en un sólo sexo, para evitar el necesario control del ciclo estral en las hembras, con la manipulación adicional que ello hubiera supuesto. Así, en la edad adulta, los grupos experimentales fueron: machos controles (♂ CONTR, inyectados durante el período predestete con vehículo) y machos tratados con naltrexona (♂ NALTX, inyectados durante el período predestete con naltrexona). Cada grupo estuvo formado por 16-17 individuos de 96-100 de edad.

### III.4 ESTUDIOS COMPORTAMENTALES

#### III.4.1 TRATAMIENTO CON NALTREXONA

El tratamiento con naltrexona fue el mismo que ya se expuso anteriormente en el apartado III.3.1 de la sección *III.3 Interacciones SOE - Sistemas Monoaminérgicos*. La valoración de los efectos comportamentales de este tratamiento subcrónico durante todo el período predestete se hizo en la edad adulta, comenzando las pruebas a los 80 días de edad.

#### III.4.2 APARATOS

Para la realización de las pruebas comportamentales de este trabajo se utilizaron una serie de aparatos cuyas características pasaremos a describir a continuación. Se eligieron con el fin de valorar una amplia variedad de parámetros comportamentales referentes a la actividad locomotora, exploración, ansiedad y emotividad, bajo distintas condiciones de estrés. Dichos aparatos fueron diseñados basándonos en la bibliografía existente así como en comunicaciones personales de otros colegas. Su fabricación se llevó a cabo en el Taller de Investigación de la Universidad Complutense de Madrid.

#### III.4.2.1 Tablero de agujeros

El recinto se diseñó siguiendo el modelo descrito por File y Wardill en 1975. Consiste básicamente en un prisma cuadrangular, descubierto, de 45 cm de altura y base cuadrada de 60 cm de lado. Las paredes del aparato son metálicas y fueron revestidas de pintura mate. Por su cara interior y a 5 cm de altura presentan un reborde de 5 cm de ancho sobre el que se asienta el suelo de forma perfectamente ajustada. Dicho suelo se fabricó de madera con una cubierta plastificada de tonalidad verde. Su superficie presenta cuatro agujeros de 3,8 cm de diámetro distribuidos uniformemente y está dividida por líneas trazadas en color rojo en 36 cuadrados de 10 cm cada uno (Fig. 4).

#### III.4.2.2 Campo abierto

Se utilizó un aparato similar al modelo de Broadhurst (1960). El recinto está formado por un cilindro, de 75 cm de diámetro y 50 cm de altura, descubierto, e iluminado uniformemente por un foco de 100 W situado a 80 cm del suelo y localizado sobre el punto central del cilindro. Dos circunferencias concéntricas, de 17 cm de diámetro la más interna y 45 cm de diámetro la más externa, y una serie de radios que parten de ellas, dividen el suelo del aparato en 19 zonas de aproximadamente igual superficie. La pared del aparato se construyó metálica y pintada en mate, el suelo, al igual que en el Tablero de agujeros, se fabricó de madera plastificada de color verde y el trazado de las circunferencias y radios se hizo en color rojo (Fig. 5).

#### III.4.2.3 Laberinto en cruz

El diseño de este aparato se realizó basándose en el modelo empleado por Pellow y col. 1985. El laberinto en cruz está compuesto de dos brazos abiertos de 50 cm de longitud por 10 cm de ancho y dos brazos cerrados, de las mismas dimensiones, con paredes de 40 cm de altura, dispuestos de manera que los brazos del mismo tipo estén uno en frente del otro. La confluencia de los cuatro brazos da lugar a una zona central cuadrada de 10 cm de lado. El aparato está construido de un material plástico rígido de color mate y está elevado del suelo 62 cm por un soporte metálico que consta de ocho patas (Fig. 6).

## ESTUDIOS COMPORTAMENTALES

### APARATOS

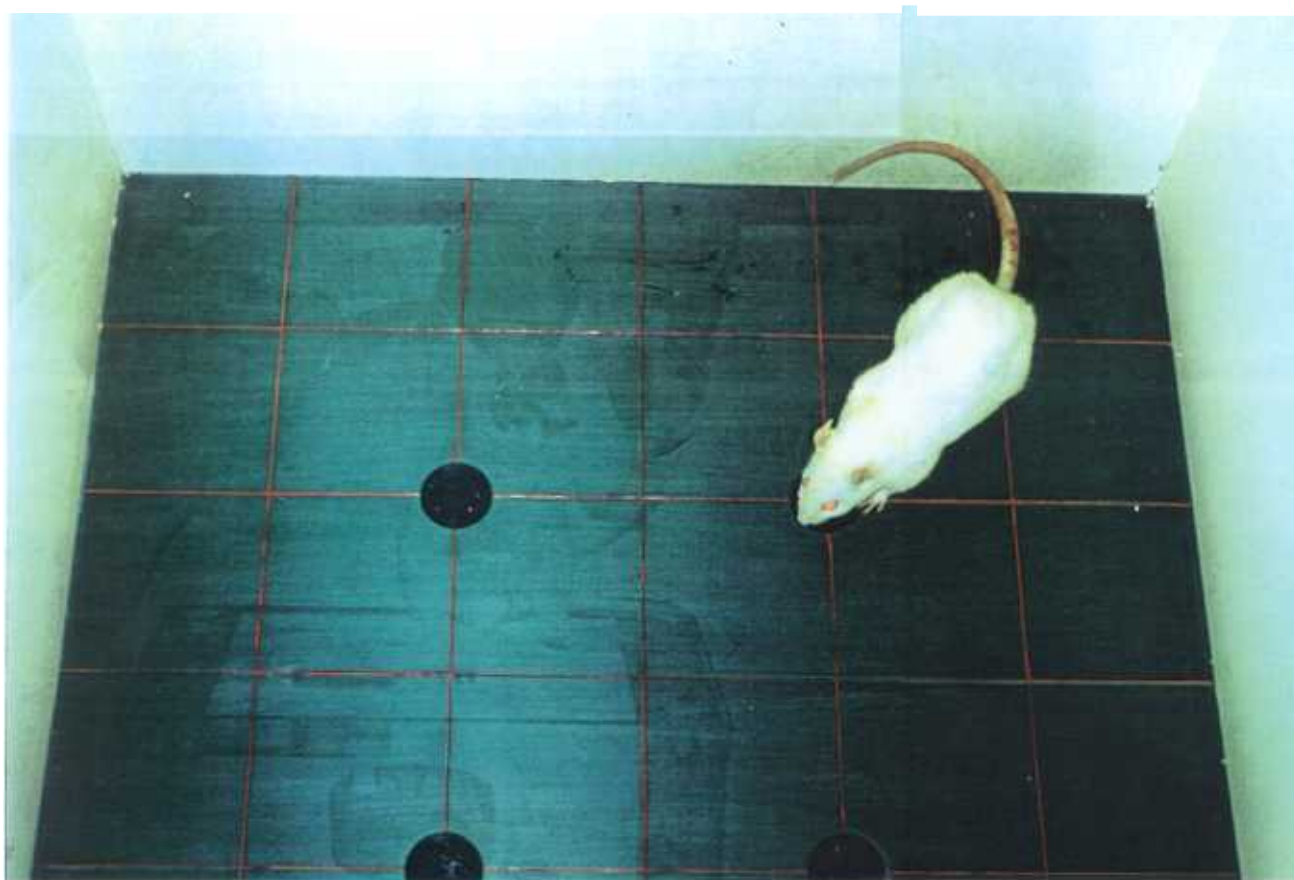


FIG. 4. Tablero de agujeros



ESTUDIOS COMPORTAMENTALES  
APARATOS

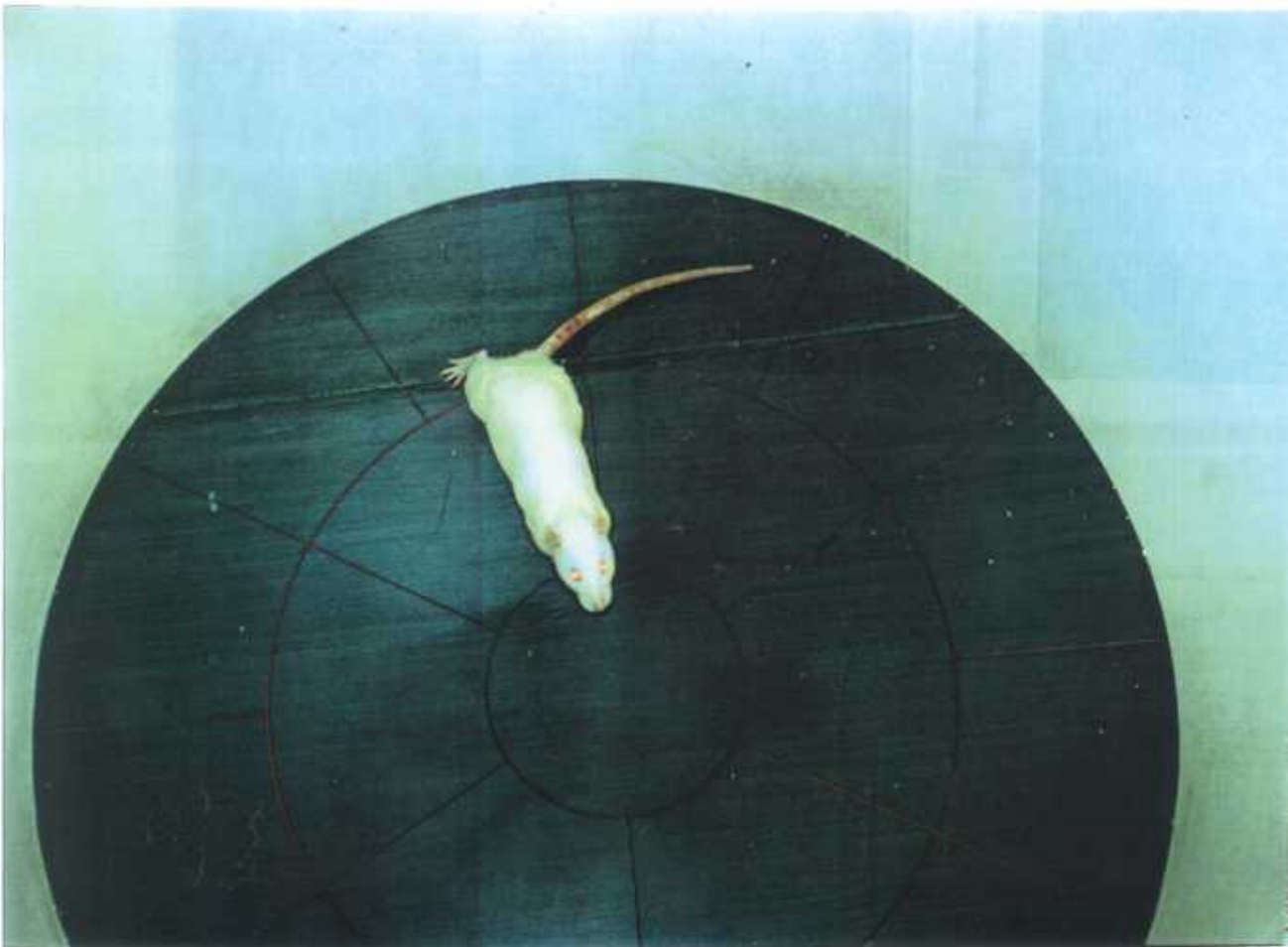


FIG. 5. Campo abierto

ESTUDIOS COMPORTAMENTALES  
APARATOS

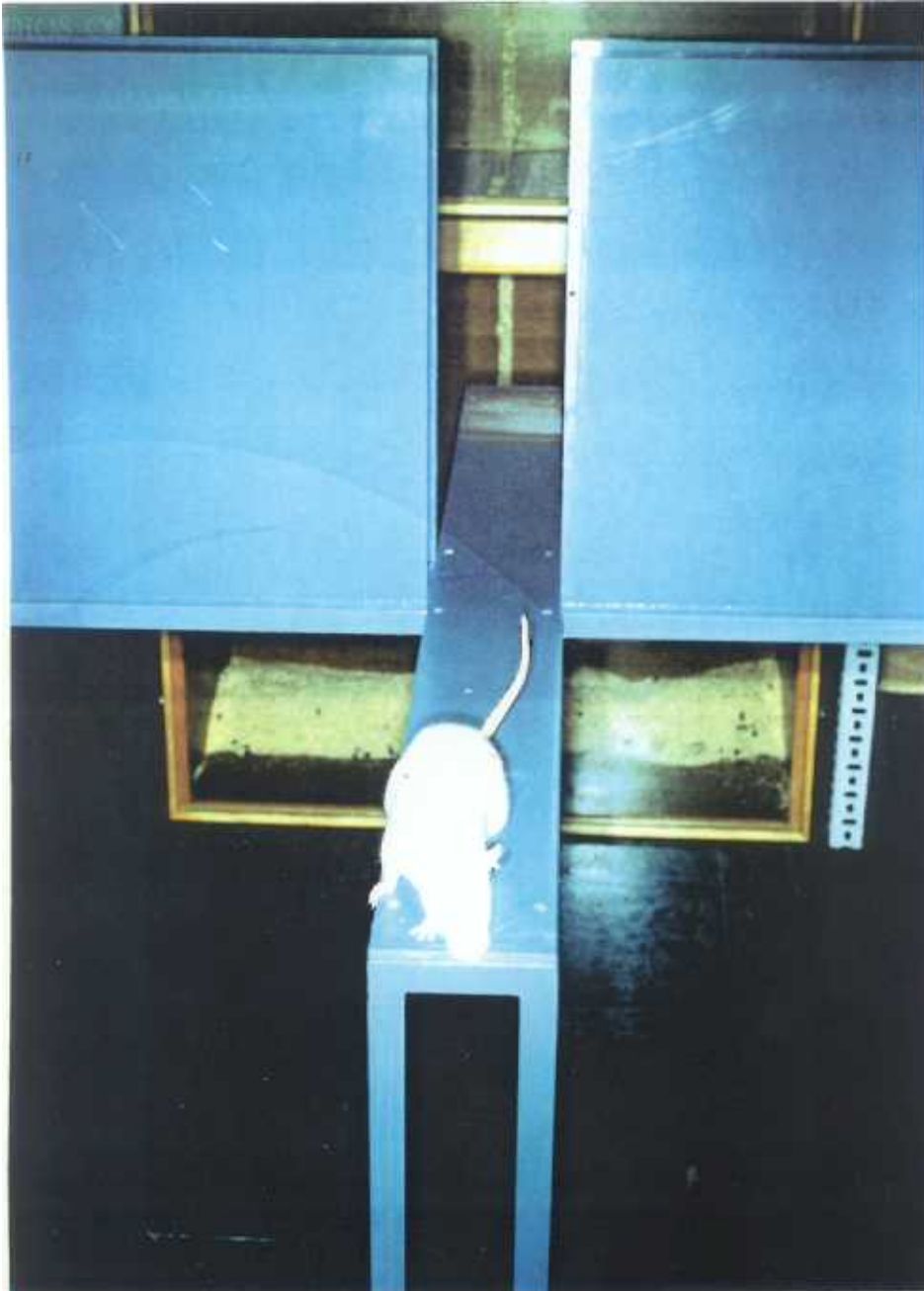


FIG. 6. Laberinto en cruz

### III.4.3 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Para el análisis comportamental se eligió una batería de pruebas comportamentales complementarias con la que hemos pretendido cubrir al máximo los efectos del tratamiento con naltrexona. Nuestro modelo de análisis comportamental ha utilizado paradigmas que se entiende implican novedad/incertidumbre (tablero de agujeros) (Kshama y col. 1990), aversión (campo abierto) (Gray 1971a, 1975, 1991) y conflicto de aproximación-evitación (laberinto en cruz) (Pellow y col. 1985). La inclusión de la prueba de campo abierto junto a las de tablero de agujeros y laberinto en cruz -una novedad en este tipo de estudios- nos ha permitido recoger una amplia información adicional sobre actividad locomotora, exploración general y emotividad, añadida a la que se obtiene sobre exploración dirigida y ansiedad de las otras dos pruebas. Además, ello supuso que las condiciones de luminosidad variaran durante el período de pruebas (luz roja/luz blanca brillante), lo que afecta al grado de estrés experimentado por los animales. Por último, la realización del campo abierto durante tres días consecutivos brinda la oportunidad de valorar los efectos del tratamiento sobre la repetición de la prueba. Se descartó utilizar las otras dos pruebas con este fin al haberse observado una habituación muy rápida para el tablero de agujeros (File 1978a) y tolerancia para tratamientos farmacológicos con la repetición de la prueba en el caso del laberinto en cruz (File y col. 1990). Por contra, realizar la prueba de campo abierto varios días es el procedimiento casi habitual desde los primeros trabajos (p.ej. Gray y col. 1965b).

Todos los animales fueron sometidos a las tres pruebas, siempre de forma individual, y se dejaron transcurrir al menos tres días entre la realización de cada una de ellas, para permitir la recuperación de los animales (esta decisión se ha visto reforzada tras los hallazgos de File y colaboradores en 1993). Dichas pruebas se sucedieron en el tiempo en el mismo orden en que se expondrán a continuación. El criterio seguido fue realizar las pruebas según el grado creciente de estrés de las mismas. En todos los casos los animales fueron situados al inicio de la prueba en la zona más neutra, desde el punto de vista comportamental, de cada aparato. Esto se hizo así con el fin de que el animal no se viera avocado artificialmente a realizar ninguna pauta en particular, especialmente ninguna que se pudiera considerar exploratoria o investigadora.

#### III.4.3.1 Tablero de agujeros

Esta prueba tuvo una duración de 5 min. (siguiendo el criterio de File y Wardill 1975), se desarrolló bajo condiciones de iluminación de luz roja y fue realizada por cada animal un solo día. La sesión comienza con el animal situado en una de las esquinas del aparato.

Se decidió introducir una modificación respecto a una de las variables que tradicionalmente se vienen midiendo en esta prueba. En este estudio se han valorado de forma separada el recorrido que el animal realiza al desplazarse por los recuadros situados

junto a las paredes (deambulaci3n externa) y el desplazamiento en la zona central alrededor de los agujeros (deambulaci3n interna), en lugar de considerarlo todo en conjunto como se ha venido haciendo, en general, hasta el momento. Las razones que nos indujeron a tomar esta decisi3n fueron de diverso tipo. Por un lado, el considerar que el hecho de que el animal se desplace por las inmediaciones del est3mulo denota una actitud m3s proclive a la exploraci3n que el hacerlo por la periferia del recinto, que parece ser m3s indicativo de su actividad general o locomotora. Por otra parte, es interesante mencionar que se ha encontrado que sustancias de tipo opioide pueden afectar el patr3n de desplazamiento en un recinto cuando se administran a ratas adultas (Mickley y col. 1990). Todo ello sin perder de vista el distinto componente emocional que puede tener para la rata -animal de clara tendencia tigmot3xica- el desplazarse junto a la pared y las esquinas frente a adentrarse en la zona central despejada del aparato. Este criterio es tenido en cuenta habitualmente a la hora de valorar por separado ambos tipos de deambulaci3n en el campo abierto. De forma simult3nea a nosotros, otro grupo ha empleado tambi3n un par3metro de este tipo para el tablero de agujeros (Albonetti y Farabollini, 1992).

As3, las variables que se midieron a lo largo de la prueba fueron las siguientes: deambulaci3n externa (DE), deambulaci3n interna (DI), exploraci3n de agujeros (EA), tiempo de exploraci3n (TE), postura erguida (PE) y defecaci3n (DEF).

Para valorar dichos par3metros se siguieron los siguientes criterios:

- Tanto la deambulación externa como la deambulación interna se contabilizaron como el número de casillas o recuadros atravesados por el animal en su desplazamiento por la periferia o por la zona central del tablero, respectivamente. La medición se hizo trazando el recorrido del animal sobre un plano del aparato. Esta forma de medición ha sido empleada anteriormente (Blizard y col. 1975).
- La exploración de agujeros se valoró como el número de veces que el animal introducía el hocico o la cabeza en el interior del agujero para explorarlo, mientras que se consideró como tiempo de exploración el tiempo en segundos que el animal invertía en esta actividad.
- La tasa de postura erguida se obtuvo contando el número de veces que el animal se elevaba sobre las patas traseras, con independencia de la zona del recinto en que se produjera esta pauta.
- La tasa de defecación se valoró como el número de bolas fecales que el animal dejaba sobre la superficie del aparato al finalizar la prueba.

### III.4.3.2 Campo abierto

La prueba se realizó durante 3 días consecutivos y cada sesión tuvo una duración de 3 min. La duración de las sesiones se decidió de acuerdo con lo observado previamente en nuestro laboratorio (González 1991; Hernández 1981, Tesis Doctoral; Viveros, observaciones no publicadas) y el criterio de otros autores (Ardila y col. 1977; Beatty y Fessler 1976; Bernardi y col. 1986; Brand y Slob, 1988; Slob y col. 1981, 1986; Studelska y Beatty 1978), que parece sugerir que es un período representativo de la actividad del animal en esta prueba. El número de sesiones se eligió a la vista de las observaciones hechas en otros trabajos de nuestro laboratorio (Sañudo 1990, Tesis de Licenciatura; Viveros y Hernández 1988) y otros autores (Ardila y col. 1977; Brand y Slob, 1988; Gray y col. 1965b, 1975; Slob y col. 1981, 1986; Stewardt y col. 1975; Valle y Bols 1976) que indican que las principales variaciones debidas a la reexposición a esta prueba tienen lugar durante los tres primeros días). El recinto estuvo iluminado con luz blanca brillante, como ya se describió en el apartado III.4.2.2 de la sección III.4.2 (*Aparatos*), aunque el resto de la habitación permaneció con luz roja. El animal se situó para comenzar la prueba en uno de los recuadros de la zona externa.

Durante el transcurso de la prueba se valoraron las siguientes variables:

Deambulación externa (DE), deambulación interna (DI), postura erguida (PE), atusamiento rostral (AR), tiempo de inmovilidad (TI) y defecación (DEF).

Estos parámetros se midieron según los criterios que se exponen a continuación:

- Para las deambulaciones externa e interna se contaron el número de zonas cruzadas por el animal durante la prueba. En el caso de la deambulación externa se consideraba un cruce cuando el animal atravesaba totalmente la línea de separación entre dos áreas situadas en el anillo externo situado junto a la pared. Para la deambulación interna se estimó que la rata exploraba un área nueva cuando atravesaba al menos con tres patas la divisoria entre dos zonas interiores o hacia una zona interior.
- Las tasas de postura erguida y de defecación se valoraron siguiendo los mismos criterios expuestos para el tablero de agujeros (apartado III.4.3.1)
- El atusamiento rostral (*grooming*) se contabilizó como el número de veces que el animal se frotaba la cabeza y el rostro con las patas delanteras a lo largo de cada sesión.
- En lo que se refiere al tiempo de inmovilidad, se estimaba que el animal permanecía inmóvil cuando se paraba y no presentaba ninguna actividad durante 2 segundos, aunque sí podía haber algún movimiento de las vibrisas (según lo definido en Pellow y col., 1985). Cada vez que esto tenía lugar.



se anotaban los segundos transcurridos con el animal en esta actitud y se sumaban los tiempos así obtenidos al final de cada sesión.

#### III.4.3.3 Laberinto en cruz

Los animales fueron sometidos a esta prueba durante un solo día. La duración de la prueba fue también de 5 min. y se utilizó iluminación de luz roja. La duración se escogió según el criterio de Pellow y col. 1985, basado en el hecho de que el comportamiento de aversión es particularmente marcado durante este tiempo pero comienza a disminuir al final de un período de 10 min. (Montgomery 1958). Al comienzo de la prueba el animal fue situado en la zona central del aparato mirando hacia un brazo cerrado. Esta decisión ya ha sido adoptada también por otros autores (Guimarães y col. 1991; Kshama y col. 1990).

Los parámetros que se contabilizaron para esta prueba fueron los siguientes:

- Número de entradas a los brazos abiertos (Eba): número de veces que el animal penetra en cualquiera de los dos brazos abiertos al menos con la cabeza y las dos patas delanteras.
- Tiempo en los brazos abiertos (Tba): tiempo en segundos que el animal pasa explorando los brazos abiertos.

- Número de entradas a los brazos cerrados (Ebc): número de veces que el animal entra en alguno de los dos brazos cerrados al menos con la cabeza y las dos patas delanteras.
- Tiempo en los brazos cerrados (Tbc): tiempo en segundos que el animal permanece en los brazos cerrados.

Asimismo se calcularon las siguientes variables:

- Porcentaje de entradas a los brazos abiertos/total (%ba/tot): representa el número de entradas en los brazos abiertos frente al número de entradas total realizadas en cualquier tipo de brazos.
- Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (%Tba): representa el tiempo pasado en los brazos abiertos frente al tiempo total explorando cualquier tipo de brazos.
- Porcentaje de tiempo en los brazos cerrados (%Tbc): representa el tiempo pasado en los brazos cerrados frente al tiempo total explorando cualquier tipo de brazos.

- Número de entradas total (E<sub>tot</sub>): número de veces que el animal entra en alguno de los brazos.
- Tiempo total en los brazos (T<sub>tot</sub>): tiempo que el animal ha pasado explorando cualquiera de los brazos.

#### III.4.4 GRUPOS EXPERIMENTALES

Atendiendo al tratamiento con naltrexona, que ya se describió anteriormente con detalle en la sección III.3.1, y al sexo de los animales, se formaron los siguientes grupos experimentales, todos ellos con animales adultos (80 días) y con al menos 16 individuos:

##### a) Grupos controles

♂ CONTR: machos inyectados durante el período predestete con vehículo

♀ CONTR: hembras inyectadas durante el período predestete con vehículo

b) Grupos tratados  
con naltrexona

♂ NALTX: machos inyectados durante el período  
predestete con naltrexona

♀ NALTX: hembras inyectadas durante el  
período predestete con naltrexona

### III.5 SEGUIMIENTO DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL DESARROLLO NEUROBIOLÓGICO Y SOMÁTICO

La determinación de estas variables de control del desarrollo postnatal se llevó a cabo en los animales mencionados para los apartados III.3 y III.4. Se trata, por tanto, del mismo tratamiento con naltrexona y los mismos grupos experimentales.

#### III.5.1 VALORACIÓN DE ADN, PROTEÍNAS Y PESO DEL CEREBELO. NÚMERO DE NÚCLEOS Y RAZÓN CONTENIDO DE PROTEÍNAS POR NÚCLEO

Estos parámetros se estudiaron en cada animal por separado (sin juntar cerebelos de más de un individuo) a los 7, 14 y 22 días y en la edad adulta ( $98 \pm 2$  días). Tras sacrificar a los animales por decapitación, realizar la craneotomía y extraer la masa encefálica sobre hielo (ver sección III.3.2), se separó el cerebelo del resto del encéfalo por medio de unas pinzas curvas y bisturí, seccionando los pedúnculos cerebelosos. Después de su obtención cada cerebelo fue pesado, con el fin de conocer su peso en fresco, e inmediatamente guardado en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

El protocolo seguido para la preparación de los cerebelos y los ensayos posteriores es el empleado en trabajos anteriores en nuestro departamento para encéfalo fetal entero (Arahuetes y col. 1991; Carretero 1989, Tesis de Licenciatura) con ligeras adaptaciones.

### III.5.1.1 Determinación de la concentración de ADN

Cada cerebelo se homogeneizó en una mezcla de solución salina [ClNa al 0,9% en agua destilada] (1ml/200mg peso fresco) y etanol al 95% (2ml/200mg) en un homogeneizador *Potter-Elvehjem*, acoplado a un rotor de 2900 rpm (1600 g). De este homogenado se tomaron las muestras para la valoración de ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas totales del cerebelo. Para la extracción del ADN del homogenado de tejido cerebelar se utilizó la técnica Schneider (1957) basada en la solubilidad de los ácidos nucleicos en ácido tricloroacético (ATC) caliente. Esta técnica requiere varias extracciones para eliminar los compuestos solubles en ácido y alcohol.

#### \*Protocolo de extracción

- Se recoge una muestra del homogenado de cerebelo (0,5ml para los animales de 7 días y 1ml para las otras edades) y se le añaden 1,25ml/ml homogenado de ATC al 10% a 5°C
- se centrifuga a 4500 rpm (2500 g) durante 10 min a 5°C
- se retira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 1.25ml/ml homogenado de ATC al 10% a 5°C

- se centrifuga nuevamente a 4500 rpm (2500 g) durante 10 min a 5°C
- se retira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 1,3 ml/ml homogenado de ATC al 5% a temperatura ambiente
- se incuba a 75°C durante 30 min [para ello se utilizó un baño de agua regulado por un termostato (*Tectrón 100, P-Selecta*) con un margen de error de  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ]
- se centrifuga a 4500 rpm (2500 g) durante 10 min y se guarda el sobrenadante que contiene los ácidos nucleicos.

#### \*Procedimiento de valoración

La concentración de ADN se determinó mediante la técnica colorimétrica descrita por Schneider en 1957, basada en que la difenilamina (DFA) al ser calentada en solución ácida reacciona con la desoxirribosa produciendo una coloración azul.

El reactivo de difenilamina (100ml ácido acético glacial, 1g DFA, 2,75 ácido sulfúrico concentrado) debe prepararse en el momento de su utilización. Se añade el reactivo a la muestra en una proporción 2:1 v/v. Para elaborar el blanco se utilizó ATC al 5% en lugar de la muestra y se le añadió igualmente el reactivo. Tras agitar las muestras y el blanco se incuban al baño maría durante 10 min. Posteriormente se enfrían hasta 20°C

y se procede a medir sus absorbancias. Esta medición se realizó utilizando un espectrofotómetro modelo *Spectronic 1201* de la casa *Milton Roy*, a una longitud de onda de 605nm. Dados los pequeños volúmenes manejados fue necesario utilizar microcubetas (10x4x45mm, *SARSTEDT*). Las valoraciones de cada muestra se hicieron por duplicado.

El cálculo de las concentraciones se realizó interpolando los valores en una curva patrón de ADN (timo de ternera, *Sigma D-8515*) mediante un análisis de regresión lineal. Finalmente, utilizando el valor del peso fresco del cerebelo de cada muestra, se expresaron dichas concentraciones por mg de tejido.

#### III.5.1.2 Determinación de la concentración de proteínas

La valoración de la concentración de proteínas totales del cerebelo se hizo a partir de muestras del homogenado del que se obtuvieron también las muestras para valorar ADN (ver sección anterior III.5.1.1). Para dicha determinación se empleó la técnica colorimétrica descrita por Lowry y col. en 1951, al igual que se indicó en la sección III.2.1.2 para los homogenados de membranas de encéfalo entero.

##### \* Procedimiento de valoración

Debido a la elevada concentración de proteínas en el homogenado de cerebelo, éste se diluyó en solución salina en una proporción 1:29 v/v, siguiendo lo aconsejado por



estudios anteriores en nuestro laboratorio (Arahuetes y col. 1991; Carretero 1989, Tesis de Licenciatura). Para su valoración se utilizaron los mismos reactivos descritos anteriormente en la sección III.2.1.2. Para este experimento se tomaron muestras de 0,2ml del homogenado diluido y se les añadió 1ml de reactivo C. Se les dejó igualmente reposar durante 10 min. Posteriormente, se les añadieron 0,1ml del reactivo de Folin diluido. Se agitaron inmediatamente y dejaron reposar también 30 min. El blanco en este caso se preparó con suero salino. La absorbancia se midió haciendo la lectura a 505nm en un espectrofotómetro modelo *Spectronic 1201* de *Milton Roy*. Cada muestra se valoró por duplicado.

Las concentraciones de proteínas se determinaron, asimismo, interpolando los valores en una curva patrón de albúmina sérica bovina por medio de un análisis de regresión lineal. Se utilizó el valor del peso fresco del cerebelo correspondiente a cada muestra para expresar la concentración por mg de tejido.

#### III.5.1.3 Cálculo del número de núcleos y de la razón contenido de proteínas por núcleo

Los contenidos de ADN y proteínas cerebelares se emplearon para determinar el número de núcleos y la proporción de proteínas por núcleo utilizando las ecuaciones propuestas por Enesco y Leblond en 1957. Dichas ecuaciones se basan en la premisa de que el ADN se encuentra en su práctica totalidad en el núcleo celular, y que esta cantidad

es constante en los todos núcleos diploides de cualquier especie (Boivin y col. 1948; Mirsky y Ris 1949).

La expresión:

$$\text{n}^{\circ} \text{ núcleos} = \frac{\text{contenido total de ADN cerebelar (mg)} \times 10^3}{6,2 \text{ (pg)}}$$

(donde 6,2 es el contenido de ADN del núcleo de una célula de rata), se utilizó para estimar el número (millones) de células cerebelosas.

El cociente de proteínas totales cerebelares por núcleo se emplea como estimación *grosso modo* del tamaño y/o diferenciación celular (Arahuetes y col. 1991; Carretero 1989, Tesis de Licenciatura; Zagon y McLaughlin 1990a). Esta razón se calculó mediante la fórmula:

$$\text{proteínas/núcleo (pg)} = \frac{\text{contenido total de proteínas cerebelares (}\mu\text{g)}}{\text{n}^{\circ} \text{ núcleos (millones)}}$$

### III.5.2 APARICIÓN DE LA APERTURA OCULAR BILATERAL

Se examinaron los ojos de cada una de los animales a partir del día 10 de vida hasta que ambos estuvieron abiertos, siguiendo el criterio dado por las observaciones hechas en anteriores trabajos y confirmadas por otros autores (Wier y col. 1989). La observación se hizo mientras los animales eran inyectados, de forma que la recogida de estos datos no supuso una manipulación adicional.

Para evaluar este parámetro se calculó el porcentaje de adquisición de la apertura de ambos ojos por cada camada. A partir de estos datos se calcularon las medias que fueron comparadas estadísticamente.

### III.5.3 CONSUMO ALIMENTARIO Y DE BEBIDA

Se controlaron diariamente las cantidades de pienso y de agua consumidas por los animales durante dos períodos: tras la finalización del tratamiento, los días 23 al 32 (período que denominaremos *postdestete* a estos efectos), y, posteriormente, durante los días 55 al 70 (período peripuberal-adulto).

Los valores de consumo alimentario y de bebida se calcularon como la diferencia entre el peso de pienso o volumen de agua suministrados a los animales y las cantidades de pienso o agua que quedaban al día siguiente a la misma hora. Estos datos se

promediaron según el número de animales que había en la jaula y a partir de estos valores se realizaron los cálculos estadísticos.

### III.5.4 EVOLUCIÓN PONDERAL

Desde el nacimiento y durante el período predestete los animales fueron pesados, conjuntamente todos los machos, y, aparte, todas las hembras, de una misma camada, en días alternos. Esto se hizo con el fin de minimizar la manipulación de los animales a estas tempranas edades, y, al mismo tiempo obtener valores para los dos sexos. Los datos obtenidos se hicieron relativos al peso dado por los animales al nacimiento, sin haber sido tratados todavía, para evitar en parte las diferencias entre camadas. Los valores así obtenidos se denominaron *tasa de crecimiento*.

Se realizó además un seguimiento del peso corporal a varias edades tras el destete hasta la edad adulta (los días 30, 40, 50, 55, 65 y 79). En este caso los pesos se obtuvieron de forma individual.

### III.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS/PC+ (Norušis 1986) instalado en un ordenador personal (286, Olivetti) compatible con el sistema IBM.

#### III.6.1 VALORACIÓN DE RECEPTORES $\mu$ PROTEÍNAS Y NOCICEPCIÓN

##### III.6.1.1 Efectos del aislamiento sexual en el desarrollo

Se estudió en primer lugar la normalidad de las distribuciones por medio de la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas utilizando el análisis de caja de Bartlett para los distintos grupos experimentales. Estas condiciones se cumplieron para las capacidades de unión máxima por mg de tejido fresco y por mg de proteínas totales, así como para la constante de disociación ( $K_d$ ) y la concentración de proteínas. Por ello, los datos de estas variables se analizaron por análisis de varianza, realizados a cada una de las edades (7, 14, 23, 30, 45 y 60 días) siendo los factores *aislamiento* y *sexo*. Para el análisis *post-hoc* se empleó la prueba de Duncan de comparaciones múltiples con una significación fijada en  $p < 0,05$  (en el texto ya no se indicará en cada caso). La evolución de los parámetros con la edad se hizo dentro de cada grupo experimental por medio de análisis de varianza de una vía seguido igualmente de la prueba de Duncan.

Los datos de las pruebas nociceptivas de inmersión de la cola y presión de la pata no satisficieron la condición de homocedasticidad, por lo que se analizaron, a cada edad y durante el desarrollo dentro de cada grupo experimental, utilizando el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba de  $U$  de Mann Whitney para las comparaciones entre los grupos dos a dos.

### III.6.1.2 Efectos del aislamiento sexual y la $\beta$ -FNA

Se pudo comprobar la normalidad y la homocedasticidad mediante las prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov y de caja de Bartlett, respectivamente, para las medias de las capacidades de unión máxima por mg de tejido fresco y por mg de proteínas totales y de la constante de disociación ( $K_d$ ). Los datos correspondientes al experimento en el que se midieron los parámetros 24hr tras la administración de  $\beta$ -funaltrexamina [ $\beta$ -FNA] (los días 1 y 8) se compararon mediante la prueba de  $t$  de Student de dos colas por tratarse de comparaciones entre dos grupos (inyectados con vehículo frente al fármaco) en que sólo interesaba comprobar la unión de este compuesto al receptor  $\mu$ . Las medias de los datos medidos a 7 y 14 días, para los experimentos en que se investigó la acción de la  $\beta$ -FNA inyectada 7 días antes en animales bajo distintas condiciones de alojamiento desde el nacimiento, se compararon a esas edades a través de análisis de varianza de tres vías (factores:  $\beta$ -FNA, aislamiento y sexo). El análisis *post-hoc* empleado fue la prueba de Duncan para comparaciones múltiples.

Los resultados concernientes a la prueba de inmersión de la cola y al contenido de proteínas no presentaron la condición de homogeneidad de las varianzas. Por esta razón, estas variables se analizaron a cada edad mediante el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis. El análisis *post hoc* para comparar las medias por pares se realizó utilizando la prueba de *U* de Mann Whitney.

### III.6.2 INTERACCIONES SOE-SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS

Los datos procedentes de las valoraciones de las monoaminas (DA y 5-HT), metabolitos (DOPAC, HVA y 5-HIAA) y del cálculo de las tasas de recambio (DOPAC/DA, HVA/DA y 5-HIAA/5-HT) en los animales de 7, 14 (subpoblación A) [ver sección IV.2.2] y 22 días de edad se analizaron por medio de análisis de varianza de dos vías (factores: *tratamiento* y *sexo*), tras comprobar la normalidad de las distribuciones (prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov) y la homocedasticidad (análisis de caja de Bartlett). El correspondiente análisis *post-hoc* se realizó mediante la prueba de Duncan de comparaciones múltiples con una significación fija de  $p < 0,05$ , que no se indicará en cada caso, por ser siempre la misma.

Para comparar los datos de las ratas machos tratadas y controles en la edad adulta, las dos subpoblaciones (A y B) que aparecieron al día 14 (ver sección IV.2.2) y comprobar el efecto del tratamiento en la subpoblación B, se empleó la prueba de *t* de Student de dos colas, por tratarse de comparaciones dos a dos [en la subpoblación B se incluyeron los dos

sexos conjuntamente por aparecer sólo dos hembras] de muestras normales y de varianzas homogéneas (tras comprobarlo por los correspondientes análisis).

El análisis de la evolución de las variables estudiadas con la edad se hizo dentro de cada grupo experimental por medio del análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de *U* de Mann Whitney para comparaciones dos a dos. No pudieron realizarse pruebas paramétricas al no satisfacerse en este caso la condición de homocedasticidad.

### III.6.3 ESTUDIOS COMPORTAMENTALES

Se comprobaron en primer lugar la normalidad de la distribución (prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov), así como la homogeneidad de las varianzas (análisis de caja de Bartlett), de las muestras de datos para los distintos grupos. En el caso de los parámetros de deambulación interna y tiempo de inmovilidad, ambos en la prueba de campo abierto, se introdujo la transformación de los datos en sus raíces cuadradas respectivas, con el fin de que así satisficieran las condiciones de normalidad y homocedasticidad. Las medias de los datos correspondientes al primer día de campo abierto (deambulación externa, deambulación interna (raíz cuadrada), postura erguida, atusamiento rostral, tiempo de inmovilidad (raíz cuadrada) y defecación) y a las pruebas de tablero de agujeros (deambulación externa, deambulación interna, exploración de agujeros, tiempo de exploración, postura erguida y defecación) y laberinto en cruz (número de entradas a los



brazos abiertos, cerrados y total, y porcentaje de entradas abiertos/total; tiempo, y porcentaje de tiempo, en los brazos abiertos y cerrados, y tiempo total en los brazos), se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías -*tratamiento* y *sexo* como factores- seguido de la prueba de Duncan de comparaciones múltiples. Recordaremos una vez más que, para esta prueba, el programa estadístico utilizado indica significación a partir de una probabilidad  $p < 0,05$  o mayor, sin precisar de que grado de significación se trata. Por ello en el texto al referirnos a comparaciones hechas con este análisis no indicaremos el grado de significación de las diferencias, ya que siempre será el mencionado anteriormente. Así las significaciones que aparezcan indicadas se referirán al análisis de varianza.

Con el fin de incluir también la valoración de los efectos de la repetición de la prueba de campo abierto a lo largo de las tres sesiones sobre los distintos parámetros mencionados anteriormente, se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) de tres vías (factores: *tratamiento*, *sexo* y *día de prueba*). Posteriormente se investigaron los efectos del tratamiento y las diferencias sexuales mediante el análisis de las medias obtenidas para los grupos experimentales en cada uno de los días a través de la prueba de Duncan de comparaciones múltiples. Las diferencias entre los distintos días de prueba para cada variable se estudiaron dentro de cada grupo mediante series de análisis *t* de Student para datos apareados. Se eligió esta prueba estadística por tratarse de comparaciones entre los valores del mismo animal, para el mismo parámetro, en cada sesión. En este caso la significación del análisis post-hoc por *t* de Student apareada sí se precisará en los resultados.

En la prueba de laberinto en cruz se quisieron comparar las medias de número de entradas, así como del tiempo que permanecieron en un tipo de brazos frente al otro, dentro de cada grupo experimental. Para este análisis se empleó la prueba de *t* de Student de dos colas, por tratarse de comparaciones entre medias dos a dos. En este caso se especificará entre paréntesis el grado de significación.

#### III.6.4 SEGUIMIENTO DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL DESARROLLO NEUROBIOLÓGICO Y SOMÁTICO

Se confirmaron tanto la normalidad de la distribución (prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov) como la homocedasticidad (análisis de caja de Bartlett) en todas las variables estudiadas, a excepción de la aparición de la apertura ocular bilateral (ver más adelante). Para los parámetros correspondientes al cerebelo (peso cerebelar, concentraciones de ADN y proteínas, número de núcleos y razón proteínas/núcleo), se realizó el análisis de varianza a cada edad siendo los factores *tratamiento* y *sexo*. La variación de los valores entre las edades estudiadas se estudió dentro de cada grupo experimental por medio de análisis de varianza de una vía. Para los consumos alimentario y de bebida, y tasa de crecimiento y peso corporal -variables que recogían la evolución durante distintos períodos y no lo sucedido en puntos clave, como en el caso anterior- se empleó el análisis de varianza de tres vías (factores: *tratamiento*, *sexo* y *edad*). El análisis *post-hoc* utilizado fue el de Duncan de comparaciones múltiples, con una significación fijada siempre en  $p < 0,05$ , por lo que en texto ya no se especificará en cada caso.

Como se indicó al principio de esta sección, no se cumplió la condición de homogeneidad de varianzas para aparición de la apertura ocular bilateral, por lo que los datos se analizaron por medio del análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Finalmente aclarar que en la tablas y gráficas, para mayor claridad, sólo se señalarán los resultados del análisis estadístico referente a los tratamientos, con la única excepción del apartado comportamental en que se incluirán los efectos de la repetición de la prueba (Tablas y gráficas) y del sexo (gráficas) por presentar una especial relevancia.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### IV.1 VALORACIÓN DE RECEPTORES $\mu$ Y NOCICEPCIÓN

##### IV.1.1 AISLAMIENTO SEXUAL

###### IV.1.1.1 Efectos sobre el desarrollo del receptor $\mu$ y contenido de proteínas

[Los niveles de significación que se muestran entre paréntesis en esta sección corresponden a los resultados del análisis de varianza. La significación para el análisis *post-hoc* de Duncan se fijó en  $p < 0,05$ ), por lo que no se especificará en cada caso (para más detalles ver sección III.6.1 sobre *Análisis estadístico*)

El análisis de varianza de las capacidades de unión máximas a cada una de las edades estudiadas, tanto por mg de tejido fresco como por mg de proteínas, sólo reveló efectos significativos al día 14. A esta edad fueron significativos para la unión máxima por mg de tejido fresco tanto el aislamiento sexual ( $p < 0,001$ ) como la interacción *aislamiento x sexo* ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas debidas al sexo *per se*. Por lo que se refiere a las capacidades de unión expresadas por mg de proteína, el análisis de varianza a los 14 días reveló un efecto significativo del aislamiento ( $p < 0,05$ ), sin que aparecieran diferencias significativas debidas al sexo o la interacción entre ambos factores. No aparecieron efectos significativos de ninguno de los factores principales ni de la interacción sobre los demás parámetros estudiados, esto es, la constante de disociación (Tabla 3), el contenido de proteínas (Tabla 4) y el peso del encéfalo (Tabla 5), a ninguna

de las edades estudiadas.

La prueba de Duncan para la capacidad de unión máxima por mg de tejido a los 14 días mostró valores *significativamente menores en los grupos aislados que en los alojados conjuntamente*, tanto en los machos como en las hembras (Fig. 7a). Además, también a esta edad y para este mismo parámetro señaló un valor *significativamente mayor en los machos alojados conjuntamente que en su correspondiente grupo de hembras*, pero no para los machos y hembras aislados, lo que indicaría que el efecto depresor del aislamiento haría que no se manifestaran las diferencias sexuales entre estos grupos. El análisis *post hoc* de los datos de la unión máxima cuando se expresa por mg de proteínas, reveló asimismo unos niveles mayores en los machos alojados conjuntamente frente a los aislados. Las hembras alojadas conjuntamente también mostraron una media *apreciablemente mayor que las aisladas* y al no haber aparecido una interacción *sexo x aislamiento* significativa no puede afirmarse que no exista efecto del aislamiento en las hembras sobre este parámetro.

El análisis de varianza de la capacidad de unión por mg de tejido por la edad en cada grupo indicó que los niveles de este parámetro se incrementan progresivamente entre los 7 y los 60 días en todos los grupos experimentales ( $p < 0,001$ ). El análisis *post hoc* indicó que en los grupos alojados conjuntamente, se produjo un aumento significativo entre los 7 y 14 días edad, y los valores del adulto ya se alcanzaron al día 23 (Fig. 7a). En los grupos aislados sexualmente no apareció aquel importante incremento en los valores de

unión máxima entre la primera y la segunda semanas de vida. Ello es debido al marcado efecto del aislamiento sexual a los 14 días, que, como vimos, deprimió significativamente los niveles de unión máxima por mg de tejido tanto en machos (un 65%) como en hembras (un 37%) (Fig. 7a). Así, la principal subida en los niveles de esta variable se produjo entre los días 14 y 23 para los grupos aislados. Cabría señalar que los machos aislados presentan todavía una elevación significativa entre el día 23 y 60, lo que podría indicar que el desarrollo de la capacidad de unión máxima podría no estar totalmente completado al día 23 en este grupo experimental.

Los resultados del análisis de varianza de una vía en cada grupo para la capacidad de unión máxima expresada por mg de proteína también revelaron variaciones significativas con la edad en todos los grupos ( $p < 0,001$ ) y la prueba de Duncan encontró que el patrón de desarrollo es diferente en los animales alojados conjuntamente y los aislados sexualmente. Los animales alojados conjuntamente de ambos sexos presentaron importantes y significativos incrementos para este parámetro entre los 7 y los 14 días, para luego sufrir un aparente descenso al día 23, con valores próximos los de los 60 días. Sin embargo, los aumentos entre las dos primeras semanas de vida en los grupos aislados no se producen (en los machos) o son menores (en las hembras aisladas), y además incrementan, en vez de disminuir, sus valores desde el día 14, alcanzando a los 23 días unos valores similares a los del día 60. Estas variaciones en el perfil entre los 7 y 23 días son reflejo de los menores niveles de unión máxima por mg de proteínas de los animales aislados frente a los alojados conjuntamente que se encontraron al día 14 (Fig. 7b). Dichas

diferencias sólo alcanzaron significación estadística entre los machos (con un descenso del 56%), aunque las hembras aisladas mostraron también valores más bajos (un 43%) que las alojadas conjuntamente con sus hermanos, por lo que las consecuencias del aislamiento sobre el perfil de desarrollo fueron similares en ambos sexos.

El perfil de desarrollo de la concentración de proteínas en las membranas celulares sufrió modificaciones con la edad ( $p < 0,001$ ) que fueron similares en todos los grupos experimentales: no se produjeron subidas significativas de las concentraciones entre los 7 y los 14 días, apareciendo una marcada elevación significativa (en torno al 60%) entre el día 14 y el día 23 (Tabla 4). Los valores de la concentración de proteínas en la membranas no aumentaron significativamente entre los 23 y los 60 días de edad.

A la vista de los resultados encontrados para las proteínas, puede concluirse que la variaciones en ambas expresiones de la capacidad de unión máxima atribuibles al aislamiento sexual durante las dos primeras semanas de vida se deberían a una actuación sobre los lugares de unión  $\mu$  y no a un efecto inespecífico sobre las proteínas de membrana en general, dado que en esta etapa no aparecieron modificaciones significativas en este último parámetro (Tabla 4). También puede confirmarse que el descenso aparente en la unión máxima expresada por mg de proteínas entre los días 14 y 23 observado en los animales alojados conjuntamente se debe a una subida del contenido de proteínas entre esas edades y no a una pérdida de capacidad de unión. Asimismo, la aproximación entre los valores encontrados para este parámetro a partir del día 23 con los aparecidos al día



7 se puede explicar por la elevación en el contenido de proteínas durante ese período frente a los 7 días.

No aparecieron diferencias significativas con la edad para la constante de disociación (Tabla 3).

Finalmente, indicar que se produjeron incrementos significativos en el peso del encéfalo durante el desarrollo postnatal ( $p<0,001$ ) desde el día 7 al día 60 (casi triplicando su valor entre estas dos edades) (Tabla 5) en todos los grupos experimentales.

#### IV.1.1.2 Efectos sobre las respuestas nociceptivas

##### \*Prueba de inmersión de la cola en agua caliente (tail immersion)

En términos generales, el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis reveló un efecto altamente significativo de aumento con la edad de los umbrales nociceptivos en todos los grupos experimentales ( $p<0,001$ ). Los incrementos en los umbrales de nocicepción se produjeron de forma progresiva con la edad (la pendiente de la curva de crecimiento general se sitúa en torno a 0,07 con un coeficiente de regresión lineal  $r=0.92$ ) (Fig. 8a), y, con la excepción de las hembras aisladas sexualmente, las latencias no aumentaron significativamente más allá del día 45.

En ambos grupos controles, se produjo un incremento significativo en las latencias nociceptivas entre los días 7 y 14 ( $p<0,01$ ), mientras los tiempos de respuesta no aumentaron entre los días 14 y 23, ni entre los días 23 y 30. Además al día 45 se alcanzan niveles que no difieren significativamente de los umbrales encontrados para los 60 días. El perfil de desarrollo es, pues, básicamente parecido en machos y hembras alojados conjuntamente.

La evolución de las latencias en los machos aislados no presentó la relativa estabilización entre los días 14 y 30 que sí se observó en los controles, aumentando entre los 14 y 23 días ( $p<0,01$ ). Además, sólo se producen incrementos en los umbrales nociceptivos a partir del día 14, y desde los 30 días los valores ya no se incrementan significativamente. Parecería que en este grupo los umbrales nociceptivos tardasen más en comenzar a aumentar con la edad y luego alcanzasen antes los niveles del día 60.

Al igual que los machos aislados, las hembras aisladas sexualmente comienzan a presentar incrementos en sus latencias de respuesta a partir de los 14 días, aunque estos se producen ya de una forma casi continuada hasta el día 60.

Al hacer comparaciones en cada edad, la prueba Kruskal-Wallis encontró diferencias significativas a los 14 (Kruskal-Wallis  $p<0,001$ ) y a los 45 días de edad (Kruskal-Wallis  $p<0,05$ ). En ambas edades se encontraron menores latencias de respuesta en los animales aislados (Fig. 8a). Sin embargo, mientras que al día 14 los descensos

fueron significativos tanto para los machos aislados (29% menores,  $p<0,05$ ) como para las hembras aislados sexualmente (45%,  $p<0,001$ ), a los 45 días sólo lo fueron para los machos aislados (una bajada del 27%,  $p<0,05$ ), si bien, en términos absolutos la hembras aisladas también mostraron un descenso similar (de un 20%).

No se encontraron diferencias sexuales significativas, a excepción de la encontrada entre animales aislados al día 60 (Kruskal-Wallis  $p<0,05$ ), en que las hembras presentaron valores más altos que los machos ( $p<0,05$ ). Dados los elevados umbrales mostrados por las hembras aisladas (aunque no llegaron a ser significativamente mayores que los de las alojadas conjuntamente,  $p=0,08$ ), más bien cabría hablar de un posible efecto diferencial del aislamiento sexual a esta edad.

#### \*Prueba de presión de la pata (*paw-pressure*)

De forma similar a lo encontrado para la prueba de inmersión de la cola, el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis encontró incrementos significativos de los umbrales de dolor para esta prueba desde el día 7 al día 60, para todos los grupos experimentales ( $p<0,001$ ). Además, y también en todos los grupos, al día 30 aparece un punto de inflexión en el desarrollo de la respuesta a esta prueba de presión de la pata (que no se encontró en la prueba anterior) (Fig. 8b), a partir del cual los aumentos con la edad se hacen mayores: la pendiente de la recta de regresión que puede calcularse a partir de los valores para los días 7 al 30 está alrededor de 3 (con un coeficiente de regresión

$r=0,90$ ), mientras que del día 30 al 60 el factor de incremento se encuentra en torno a 15 ( $r=0,97$ ). Es decir, del día 30 en adelante los umbrales aumentan 3 veces más por edad. Por otra parte, los incrementos parecen producirse de una forma bastante lineal en los dos tramos (como puede deducirse de los coeficientes de regresión obtenidos) y son proporcionalmente mayores a los encontrados para la prueba con estímulo termal (tal como puede observarse al comparar las pendientes de crecimiento de ambas pruebas).

En los animales alojados conjuntamente de ambos sexos se produjeron aumentos significativos tanto entre los 7 y 14 días ( $p<0,01$ ) como a partir del día 30 ( $p<0,01$ ), mientras que, de forma parecida a lo sucedido en la prueba de inmersión de la cola, los incrementos entre los días 14 al 30 no alcanzaron significación. Sin embargo, tanto en los machos como en las hembras aislados sexualmente también aumentaron los umbrales nociceptivos durante los 14 y los 30 días ( $p<0,05$ ).

Al hacer comparaciones a cada edad la prueba de Kruskal-Wallis sólo encontró diferencias significativas a los 7 días ( $p<0,05$ ), que se manifestaron como unos mayores umbrales en las hembras aisladas frente a las alojadas conjuntamente (un 54%,  $p<0,05$ ) (Fig. 8b). El incremento encontrado para los machos aislados (un 32% más que los alojados conjuntamente) no fue estadísticamente significativo.

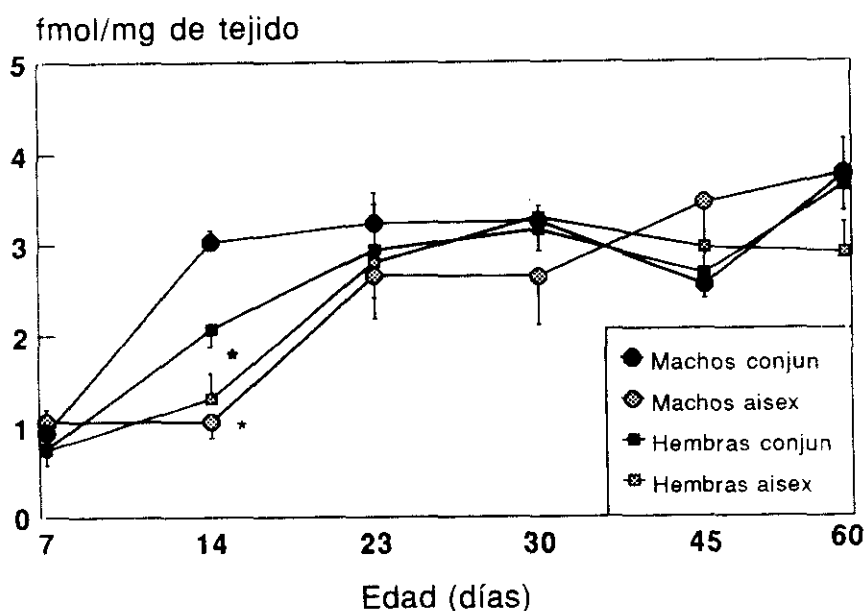
No se encontraron diferencias sexuales para esta prueba a ninguna de las edades estudiadas.

#### **IV.1.1.3 GRÁFICAS Y TABLAS**

# Efectos del aislamiento sexual

## Desarrollo del receptor $\mu$

### a) Unión al receptor $\mu$ (expresada por mg de tejido)



### b) Unión al receptor $\mu$ (expresada por mg proteínas)

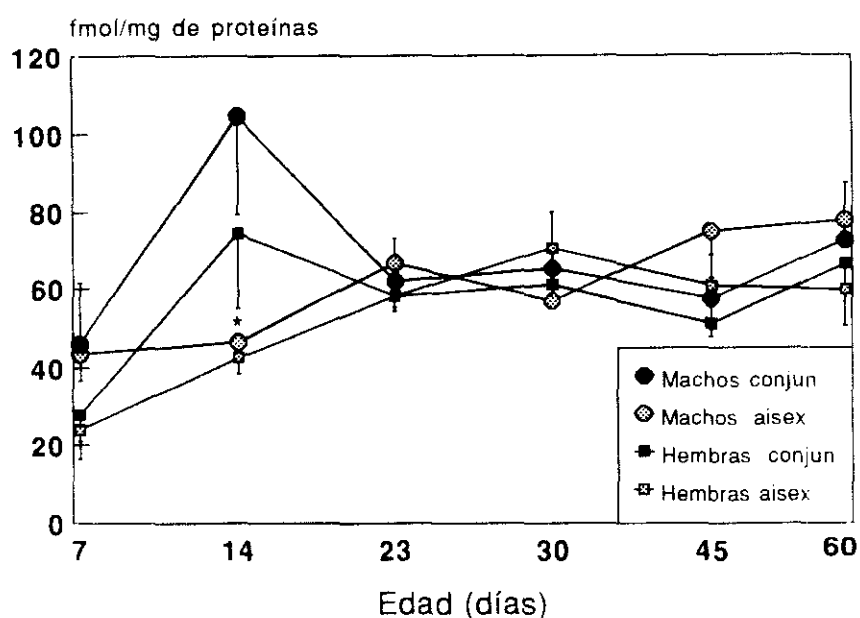


FIG. 7. Cada punto representa la media  $\pm$  e.e.m de 3-4 determinaciones de Scatchard de la capacidad máxima de unión a DAMGO tritinado. \* $p < 0.05$  frente al grupo control correspondiente (prueba de Duncan)

**TABLA 3**

EFFECTO DEL AISLAMIENTO SEXUAL SOBRE EL DESARROLLO DE LA AFINIDAD DE LA UNIÓN AL RECEPTOR  $\mu$   
EN EL ENCÉFALO (Constante de disociación ( $K_d$ ) del [ $^3$ H] DAMGO expresada en nM)

	7 días	14 días	23 días	30 días	45 días	60 días
♂ CONJUN	0,65±0,09	1,03±0,13	0,84±0,04	0,82±0,17	0,77±0,06	0,73±0,07
♂ AISEX	0,87±0,27	0,58±0,05	0,60±0,11	0,66±0,06	0,76±0,16	1,15±0,07
♀ CONJUN	0,59±0,10	0,90±0,18	0,78±0,12	0,83±0,13	0,79±0,04	0,75±0,11
♀ AISEX	0,55±0,10	0,43±0,05	0,64±0,20	0,78±0,20	0,67±0,22	1,05±0,24

**TABLA 4**

EFFECTO DEL AISLAMIENTO SEXUAL SOBRE EL DESARROLLO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS DE  
MEMBRANA ENCEFÁLICAS ( $\mu$ g de proteínas/mg de tejido)

	7 días	14 días	23 días	30 días	45 días	60 días
♂ CONJUN	20,8±2,2	32,2±6,6	52,4±5,1	50,1±1,0	47,9±9,2	51,9±0,5
♂ AISEX	23,9±7,4	22,8±4,2	39,9±0,7	47,1±1,4	46,3±1,9	49,1±2,1
♀ CONJUN	31,5±9,0	31,7±7,5	50,2±5,8	52,4±3,9	54,5±7,2	56,6±8,2
♀ AISEX	31,1±0,8	31,0±6,9	47,4±8,4	47,2±1,8	49,3±1,7	49,5±2,3

Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 3-4 mediciones.

**TABLA 5**  
EFECTO DEL AISLAMIENTO SEXUAL SOBRE EL DESARROLLO DEL PESO DEL ENCÉFALO (g)

	7 días	14 días	23 días	30 días	45 días	60 días
♂ CONJUN	0,80±0,04	1,60±0,01	1,65±0,03	1,84±0,06	2,00±0,05	2,20±0,08
♂ AISEX	0,82±0,05	1,42±0,09	1,80±0,03	1,86±0,09	2,05±0,06	2,14±0,09
♀ CONJUN	0,76±0,01	1,56±0,07	1,53±0,05	1,73±0,04	1,98±0,06	2,08±0,08
♀ AISEX	0,90±0,07	1,42±0,06	1,66±0,06	1,77±0,05	2,01±0,04	2,21±0,05

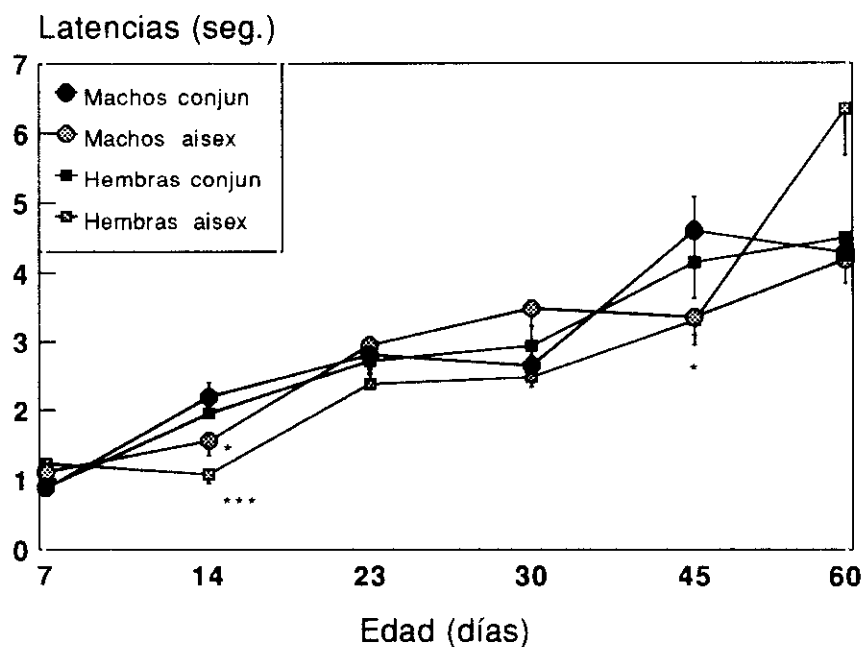
Los valores representan la media ± e.e.m. de 3-4 mediciones.



# Efectos del aislamiento sexual

## Desarrollo de las respuestas nociceptivas

### a) Desarrollo de la respuesta a la prueba térmica



### b) Desarrollo de la respuesta a la prueba de presión

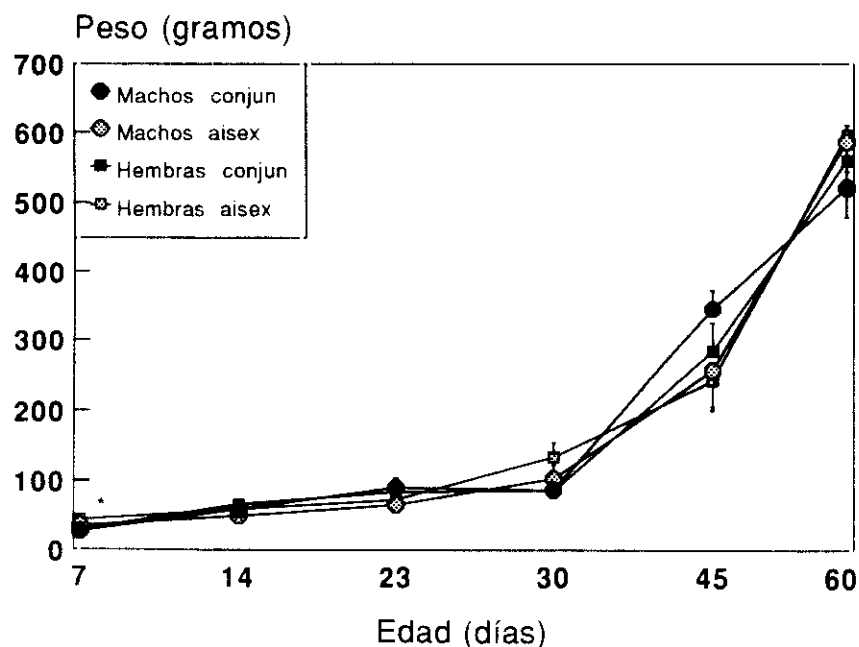


FIG. 8. Cada punto representa la media  $\pm$  e.e.m de 6-14 observaciones. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  frente al grupo control correspondiente (prueba U de Mann-Whitney)

#### IV.1.1.4 DISCUSIÓN

De acuerdo con estudios anteriores (Bardo y col. 1981; McDowell y Kitchen 1987; Petrillo y col. 1987; Spain y col. 1985; Tsang y col. 1982ab; Volterra y col. 1986), nuestros resultados indican que el desarrollo completo de los receptores  $\mu$  se alcanza en la tercera semana de vida postnatal y que el número de sitios de unión se multiplica por 3 desde el día 7 en adelante. Más aún, esto parece ocurrir igualmente en ambos sexos. Además la ausencia de cambios en los valores de la constante de disociación a lo largo del desarrollo encontrada en este trabajo pone de manifiesto que, como suele aparecer generalmente en este tipo de estudios, los incrementos en la capacidad de unión con la edad se deben a elevaciones en las concentraciones de receptores y no a cambios en la afinidad del receptor por el ligando (McDowell y Kitchen 1987; Kitchen y col. 1990; Petrillo y col. 1987, Spain y col. 1985).

Por lo que se refiere a la crianza en condiciones de aislamiento sexual, parece que esta forma de modificación del ambiente social afecta fundamentalmente a las edades más tempranas. De hecho, nuestros resultados sugieren la existencia de un retraso en el desarrollo de los receptores  $\mu$  en los grupos aislados sexualmente, dado que el mayor crecimiento del número de sitios de unión se produce a una edad más tardía (entre los 14 y 23 días en vez de entre los 7 y los 14). El efecto encontrado en nuestro estudio no parece ser debido a una acción inespecífica del aislamiento sexual sobre las proteínas de la membrana celular, puesto que no hemos encontrado un efecto importante sobre este

parámetro en el presente trabajo. También parece claro que la propia proteína del receptor  $\mu$  no se vería afectada por el aislamiento sexual, dado que la afinidad del receptor no se modificó entre los distintos grupos experimentales. Aunque es escasa la información concerniente a los posibles efectos del ambiente social temprano sobre el desarrollo de los receptores opioides, nuestros resultados están de acuerdo con los de Panksepp y Bishop de 1981, que encontraron que la capacidad de unión de [ $H^3$ ] diprenorfina (antagonista opioide general) en encéfalo parece variar cuando se agrupa a las ratas de 33 días previamente aisladas socialmente.

Es interesante señalar la marcada subida de la concentración de proteínas de membrana entre los días 14 y 23, que está en concordancia con los cambios hallados por otros autores en el contenido de proteínas durante el desarrollo postnatal en varias regiones encefálicas de la rata (Bayon y col. 1979). Ello explica la bajada que se produce entre esas edades en el número de sitios de unión cuando se expresa por mg de proteínas (que no sucede cuando se expresa por mg de tejido) y nos permite descartar un descenso de los niveles de receptores a partir de los 14 días. Un hecho similar ha sido encontrado por otros autores (Petrillo y col. 1987; Spain y col. 1985; Tsang y col. 1982b). Este fenómeno revela el interés de analizar otras variables relacionadas, especialmente cuando se hacen estudios en el desarrollo y que pueden asimismo verse modificadas, interfiriendo con los resultados obtenidos para los receptores. El seguimiento de los niveles de proteínas puede ser especialmente recomendable dado que muchos autores expresan sus resultados haciéndolos relativos a este parámetro (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987).

No han aparecido diferencias sexuales muy claras en lo que se refiere al desarrollo del receptor  $\mu$ , aunque los datos de la capacidad de unión cuando se expresan por mg de peso de tejido fresco (pero no por mg de proteína) sugieren menores niveles para las hembras al día 14. Sin embargo, podría decirse que el efecto del aislamiento sexual parece ser menos marcado en las hembras, dado que las hembras aisladas presentaron menores descensos en las concentraciones de receptores  $\mu$  (tanto por mg de proteínas como por mg de tejido) que los machos aislados al día 14, comparados con sus respectivos grupos alojados conjuntamente. Además los machos aislados sexualmente (pero no las hembras aisladas) no alcanzaron el desarrollo completo del receptor a los 23 días. Esto estaría de acuerdo con el concepto comunmente asumido de que los machos serían más sensibles a diversos ambientes estresantes (Gray 1971ab, 1991). En resumen, podría decirse que las edades tempranas son cruciales para el desarrollo del receptor  $\mu$  y que durante este período tiene lugar la mayor sensibilidad del receptor al procedimiento de aislamiento sexual utilizado en este estudio.

Por lo que se refiere a las pruebas nociceptivas, nuestros datos indican que, tanto en los grupos aislados sexualmente como en los que se alojaron conjuntamente animales de los dos sexos, los umbrales nociceptivos para los estímulos térmico y mecánico aumentan con la edad, lo que está en concordancia con resultados anteriores (Blass y col. 1993; McDowell y Kitchen 1987). Conviene precisar, sin embargo, que la utilización de las dos pruebas elegidas (*inmersión de la cola* y *presión de la pata*) nos ha permitido en este trabajo precisar de forma más detallada cómo se produce esta evolución de las

respuestas nociceptivas durante el desarrollo. Se produjeron incrementos significativos de los umbrales de dolor hasta el día 45 para la prueba con estímulo térmico y hasta los 60 días para la de presión, mientras que no aparecieron diferencias sexuales entre los grupos alojados en condiciones estándar para ninguna de las pruebas empleadas en el rango de edades objeto de nuestro estudio. En trabajos anteriores se han observado efectos específicos del sexo en la respuesta a otros estímulos dolorosos como el choque eléctrico, lo que sugeriría la existencia de un papel de las hormonas gonadales (Romero y Bodnar 1986). También se ha encontrado que tanto las formas opioides como no opioides de analgesia inducidas por el estrés de natación forzada están afectadas por diferencias sexuales (Bodnar y col. 1988). La ausencia de diferencias sexuales en este trabajo señala la importancia del tipo de estímulo doloroso a la hora de observar diferencias sexuales. También sería posible que, dado que la última edad estudiada se corresponde con el comienzo de la pubertad, sea necesario todavía un papel adicional de las hormonas gonadales para la aparición de posibles diferencias sexuales.

En cuanto al aislamiento sexual, la prueba de inmersión de la cola parece ser más sensible a los efectos de esta manipulación que la prueba de presión de la pata, y los resultados sugieren una mayor sensibilidad de los animales aislados a los estímulos térmicos. Las modificaciones en los umbrales nociceptivos en ambas pruebas sólo aparecieron en determinadas edades y constituyen los primeros datos disponibles sobre modificaciones en la respuesta nociceptiva basal en ratas aisladas sexualmente. Las respuestas nociceptivas a la prueba de presión de la pata sólo se vieron alteradas a los 7

días en las hembras, que presentaron mayores umbrales nociceptivos. Por lo que se refiere a la prueba de inmersión de la cola en agua caliente, las diferencias en los machos aislados fueron siempre en el sentido de descenso de las latencias de respuesta, mientras que en las hembras se encontró un efecto opuesto entre las dos primeras semanas (descenso) y los 60 días (incremento de los umbrales). Nuestros resultados de ambas pruebas podrían sugerir, pues, un efecto diferente del tratamiento según el sexo, aunque los datos obtenidos a este respecto no son concluyentes.

En general, puede decirse que los resultados de las pruebas nociceptivas están en consonancia con estudios anteriores que indican que las variaciones del ambiente neonatal pueden modificar la modulación de la respuesta al dolor (ver por ejemplo Alleva y col. 1986; Enters y Spear 1988; Puglisi-Allegra y Oliverio 1983; Spear y col. 1985) y, más en concreto, con los hallazgos de que la separación de la madre pueda producir analgesia en ratas neonatales (Kehoe y Blass 1986b) o de que un breve aislamiento social incremente la sensibilidad al dolor en ratas juveniles (Panksepp 1980).

No es posible establecer correlaciones claras entre los resultados obtenidos para la concentración de receptores y las pruebas de nocicepción, aunque la edad a la que se produce el mayor efecto del aislamiento sexual en la prueba térmica coincide con el principal efecto sobre los receptores  $\mu$ . El descenso en el número de sitios de unión opioide sería coherente con la mayor sensibilidad al dolor observada a los 14 días de edad. En todo caso, debe tenerse en cuenta que los umbrales de dolor están regulados de forma compleja

por sistemas tanto opioides como no opioides (Allewa y col. 1986; Beitz 1992; Enters y Spear 1988; Goicoechea 1991, Tesis de Licenciatura; Iggo y col. 1985; Jordan y Oehme 1985; Lewis 1986; Lewis y col. 1980; Spear y col. 1985; Wiesenfeld-Hallin y Xu 1992), por lo que es difícil explicar las variaciones en la nocicepción en términos de un sólo parámetro. Esta dificultad ha sido puesta de manifiesto también por otros autores en trabajos durante el desarrollo (Blass y col. 1993).

La diferente sensibilidad de los dos tipos de respuestas estudiadas al tratamiento de aislamiento sexual se debe posiblemente a que resultan de la estimulación de distintas vías neurofisiológicas. Así, se acepta que las pruebas que emplean el calor como estímulo doloroso implicarían fundamentalmente a los receptores  $\mu$  opioides, mientras que los receptores  $\kappa$  tendrían efectos más potentes en la regulación de la percepción de las acciones de otros tipos de agentes nociceptivos (Tyers 1980, 1982). La relativa conexión entre las variaciones en el receptor  $\mu$  debidas al aislamiento sexual y los efectos sobre la prueba de inmersión de la cola en agua caliente (pero no sobre la prueba de presión) estaría de acuerdo con esta interpretación.

En relación a los posibles mecanismos responsables de las diferencias inducidas por el aislamiento sexual, es probable que las influencias hormonales sean en parte responsables de la perturbación encontrada en el desarrollo los receptores, puesto que se conoce que los receptores  $\mu$  y la  $\beta$ -endorfina (péptido opioide endógeno) influyen sobre la función hipotálamo-hipofisaria (Tuomisto y Mannisto 1985). Además, existen evidencias

experimentales que apoyan una implicación del sistema opioide encefálico en la regulación de las interacciones sociales (Herman y Panksepp 1978; Panksepp y col. 1978) y se ha encontrado que el funcionamiento del sistema opioide y la nocicepción pueden ser afectados por el ambiente social (Alleva y col. 1986; Enters y Spear 1988; Spear y col. 1985). Más aún, la  $\beta$ -endorfina parece suprimir la motivación sociosexual en ratas adultas, siendo este efecto reversible por naloxona (antagonista opioide general) (Wiesner y col. 1986), y la administración de este antagonista en ratas neonatales causa una reducción en el juego social (Siegel y Jensen 1986). Asimismo, los mencionados sistemas neuroendocrinos tanto opioides como no opioides que pueden interactuar en la modulación de los umbrales de dolor (Alleva y col. 1986; Beitz 1992; Enters y Spear 1988; Goicoechea 1991, Tesis de Licenciatura; Iggo y col. 1985; Jordan y Oehme 1985; Lewis 1986; Lewis y col. 1980; Millan y col. 1991; Spear y col. 1985; Wiesenfeld-Hallin y Xu 1992) también podrían estar implicados en los efectos del aislamiento sexual llevado a cabo en este trabajo. En este sentido, otros autores han observado que los sistemas funcionales que median la analgesia opioide podrían verse afectados por la composición sexual de la camada (Alleva y col. 1986). De hecho, debe considerarse la diferente interacción de la madre con las crías dependiendo del sexo de la camada, con la subsiguiente influencia sobre los neonatos (Alleva y col. 1986, 1989; Moore y Morelli 1979; Richmond y Sachs 1984). Otra cuestión importante es el aislamiento olfatorio. Se ha probado que los olores son estímulos de capital influencia sobre el comportamiento de las ratas tanto adultas (Mackay-Sim y Laing 1981) como neonatales (Kehoe y Blass 1986a; Smith y Spear 1978). Es más, las feromonas presentes en la orina parecen afectar el



comienzo de la pubertad, ciclo sexual y comportamientos sexual y sociosexual tanto en ratas machos como hembras (para revisión ver Fernández-Tresguerres 1989). Así, no se puede excluir la posibilidad de que la ausencia de olores/feromonas de los hermanos del otro sexo tuviera un papel responsable en los efectos observados para el protocolo de aislamiento sexual empleado en nuestro trabajo.

Aunque el aislamiento sexual resulta un modelo de condiciones ambientales de especial significación biológica en el contexto de posibles modificaciones del ambiente social, son pocos los trabajos que han utilizado este tratamiento (Alleva y col. 1986; Laviola y Loggi 1992; Sharpe 1975; Van de Poll y col. 1982). Este estudio es el primero en tratar la influencia del aislamiento sexual sobre el desarrollo del sistema opioide en ratas de ambos sexos. Además, pone de manifiesto la necesidad de analizar otras variables encefálicas que pudieran verse modificadas en las condiciones en que tiene lugar el experimento (en nuestro caso, las proteínas de la membrana celular). Nuestros resultados sugieren que las edades postnatales tempranas son de una importancia fundamental para el desarrollo de los receptores  $\mu$ , ya que es precisamente a estas edades cuando tanto los receptores como las respuestas nociceptivas parecen ser especialmente sensibles al tratamiento de aislamiento sexual utilizado.

#### IV.1.2 AISLAMIENTO SEXUAL Y $\beta$ -FNA

##### IV.1.2.1 Efectos sobre el receptor $\mu$ y contenido de proteínas

[Los resultados del análisis de varianza y de la prueba de  $t$  de Student se muestran entre paréntesis. Se fijó igualmente la significación para la prueba *post-hoc* de Duncan en  $p < 0.05$ , por tanto no se indicará de nuevo para cada comparación (para más detalles ver sección III.6.1 sobre *Análisis estadístico*)

La inyección de  $\beta$ -FNA tanto al día 0 como al día 7 disminuyó el número de sitios de unión  $\mu$  en el encéfalo cuando se midieron 24h más tarde, tanto expresados por mg de tejido como por mg de proteínas (Fig. 9ab y Fig. 10ab). El número de sitios se redujo en más de la mitad al día 1 ( $t$  de Student  $p < 0.05$ , en los dos sexos), efecto depresor que también se observó en los machos al día 8 ( $t$  de Student  $p < 0.05$ ). La reducción del número de sitios  $\mu$  en las hembras al día 8 fue menos marcado (un 30% de descenso,  $t$  de Student  $p < 0.05$ ) (Fig. 10ab). El contenido total de proteínas de membrana celular en el encéfalo no se alteró 24h tras la administración de  $\beta$ -FNA (Fig. 9c y Fig. 10c)

En los animales de 7 días inyectados con  $\beta$ -FNA el día 0, el análisis de varianza de 3 vías reveló un efecto significativo de la  $\beta$ -FNA ( $p < 0.001$ ) sobre la capacidad de unión por mg de tejido, sin que fueran significativos el *sexo* o el *aislamiento* ni las interacciones entre los factores. Este efecto aparece como un descenso general en el número de sitios

de unión  $\mu$  (Fig. 11a). Cabe hacer notar que, en los grupos de machos se observa un cierto *efecto escalera*, entendido como un descenso progresivo en los valores de la media a lo largo de los grupos entre los animales alojados conjuntamente inyectados con vehículo y los aislados sexualmente inyectados con  $\beta$ -FNA, que presentan las mayores diferencias entre sus medias (un 22%) y significación estadística para el análisis de Duncan. Por lo que se refiere a las hembras, también las aisladas e inyectadas con  $\beta$ -FNA al nacimiento mostraron una media de capacidad de unión por mg de tejido inferior al resto de los grupos. El análisis *post hoc* reveló que el valor encontrado para este grupo experimental era significativamente menor que el de las aisladas inyectadas con vehículo (con un valor 21% menor en la media). En cambio, cuando la capacidad de unión se hace relativa a la concentración de proteínas, el tratamiento con  $\beta$ -FNA produce una elevación significativa del número de sitios  $\mu$  ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 11b). Tampoco el sexo, ni el aislamiento ni las interacciones fueron significativas en este caso. El análisis de Duncan sólo encontró significativas las diferencias por el tratamiento con  $\beta$ -FNA entre los machos aislados sexualmente (un 43%) y entre las hembras alojadas conjuntamente (un 96%), aunque también se producen entre los machos controles (un 27%) y las hembras aisladas (un 24%). Junto esto, la no existencia de una interacción  $\beta$ -FNA x aislamiento nos lleva a concluir que la  $\beta$ -FNA produjo subidas en los niveles de unión por mg de proteínas con independencia de las condiciones de alojamiento estudiadas. Es de señalar que, a pesar de que el efecto del aislamiento sexual no alcanzó significación estadística, es notable la diferencia entre las hembras alojadas conjuntamente y las aisladas (con unos niveles de unión un 56% más elevados en las aisladas sexualmente).

El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas en los grupos para las concentraciones de proteínas en los homogenados de membranas celulares encefálicas a los 7 días ( $p < 0,001$ ). La  $\beta$ -FNA hizo descender los niveles de proteínas en los dos sexos tanto en los animales alojados conjuntamente ( $\sigma^{\text{♂}}$  38%;  $\sigma^{\text{♀}}$  54%) como en los aislados sexualmente ( $\sigma^{\text{♂}}$  40%;  $\sigma^{\text{♀}}$  39%) [con una significación  $p < 0,05$  en todos los casos] (Fig. 12). Estos descensos en las concentraciones de proteínas de membrana causados por la  $\beta$ -FNA serían la explicación de las elevaciones encontradas para la capacidad de unión máxima a los sitios  $\mu$  cuando se expresan en función de este parámetro (y que no se vieron cuando se hace relativa al peso, sino que aparecieron descensos) (Fig. 11ab). Por su parte, el aislamiento sexual produjo en las hembras aisladas e inyectadas con vehículo (pero no en los machos aislados) una bajada del 34% en la concentración de proteínas ( $p < 0,05$ ) (Fig. 12). También apareció un pequeño, aunque significativo, efecto del aislamiento sobre las proteínas de membrana en las hembras inyectadas con  $\beta$ -FNA (un descenso del 12%,  $p < 0,05$ ). Es posible que el valor considerablemente mayor de la capacidad de unión máxima por mg de proteína encontrado para las hembras inyectadas con vehículo y aisladas, frente a la de sus correspondientes alojadas conjuntamente (Fig. 11b), pudiera deberse al importante descenso en el contenido de proteínas observado al hacer la misma comparación.

En los grupos de 14 días inyectados al día 7, el análisis de varianza para los datos relativos a la capacidad de unión por mg de tejido sólo reveló un efecto significativo de la  $\beta$ -FNA ( $p < 0,05$ ), mientras que cuando se expresa por mg de proteínas la significación

aparece para las interacciones  $\beta$ -FNA x aislamiento ( $p<0,05$ ) y aislamiento x sexo ( $p<0,05$ ). El análisis de Kruskal-Wallis de la concentración de proteínas de membrana encontró diferencias significativas entre los grupos ( $p<0,05$ ). La  $\beta$ -FNA causó un descenso general en los sitios unión  $\mu$  por mg de peso fresco, que en las hembras fue de un 11% en las alojadas conjuntamente y de un 13% en las aisladas sin que alcanzaran significación estadística al analizarse los grupos dos a dos (Fig. 13a). En cuanto a los machos tratados con  $\beta$ -FNA, los alojados conjuntamente presentaron una importante y significativa disminución de este parámetro (de un 26%) frente a los inyectados con el vehículo, mientras que el tratamiento con  $\beta$ -FNA no produjo variaciones en la media de los machos aislados. Por lo que se refiere al contenido de proteínas, el aislamiento sexual produjo un incremento significativo de las concentraciones en los machos tanto en los inyectados con vehículo (un 75%,  $p<0,05$ ) como con  $\beta$ -FNA (36%,  $p<0,05$ ) (Fig. 14). El tratamiento con  $\beta$ -FNA a los 7 días no afectó al contenido de proteínas en las membranas celulares encefálicas a los 14 días en ninguno de los dos sexos. Cuando la capacidad de unión a los sitios  $\mu$  se expresa referida a la concentración de proteínas, se observa que la  $\beta$ -FNA produce una reducción en este parámetro cuando la comparación se hace entre los grupos alojados conjuntamente ( $\sigma^{\text{♂}}$  26%;  $\sigma^{\text{♀}}$  24%) (Fig. 13b); mientras que si lo que se comparan son los grupos aislados sexualmente se encuentra que el tratamiento con  $\beta$ -FNA produce un aumento en los machos tratados con  $\beta$ -FNA (un 55%) y una disminución en las hembras de menor magnitud que la observada entre las alojadas conjuntamente (un 14%). Esta diferencia explicaría la interacción  $\beta$ -FNA x aislamiento que apareció en el análisis de varianza para este parámetro. El aislamiento sexual parece disminuir la unión por mg

de proteína sólo en los machos (un 52%), lo que justifica que fuera significativa la interacción aislamiento x sexo. Las diferencias entre los resultados de la capacidad máxima cuando se expresan por mg de proteína y por mg de tejido se deben fundamentalmente al efecto del aislamiento sexual sobre las concentraciones de proteínas en los machos (Fig. 14). Así, la bajada en los niveles de unión en los machos aislados inyectados con vehículo y el que desaparezcan las diferencias entre los machos tratados con  $\beta$ -FNA se debe a las subidas en el contenido de proteínas producidas por el aislamiento sexual.

No se produjeron diferencias significativas en las constantes de disociación (Tabla 6) ni para el peso del encéfalo (Tabla 7) en ninguna de las dos edades.

#### IV.1.2.2 Efectos sobre las respuestas nociceptivas

El ajuste de la temperatura a cada edad introducido para la prueba de inmersión de la cola en agua caliente en esta segunda parte del estudio ha supuesto, en primer lugar, que las latencias de respuesta sean similares en los animales controles para los dos tratamientos a los 7 y los 14 días, lo que permite una mejor apreciación de los efectos diferentes de los tratamientos a esas edades. Además, el que las latencias de respuesta en los animales de 7 días se vean muy apreciablemente aumentadas con esta adaptación ( $\sigma$  84% y  $\varnothing$  150% frente a las latencias de los correspondientes grupos alojados conjuntamente de la primera parte), hace que se situen en un rango de magnitud dentro de el que es posible conseguir una mayor fiabilidad en la medida.

El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas tanto al día 7 ( $p < 0,001$ ) como al día 14 ( $p < 0,001$ ). A los 7 días el aislamiento sexual desde el nacimiento incrementó la sensibilidad al dolor tanto en los machos como en las hembras inyectados con vehículo, aunque se encontraron diferencias significativas en las comparaciones *post hoc* para los machos ( $p < 0,01$ ), pero no para las hembras ( $p = 0,06$ ) (Fig. 15a). Sin embargo, dado que la tendencia mostrada fue claramente la misma en ambos sexos (un descenso de las latencias del 33% en los machos y del 66% en las hembras) cabe atribuir la falta de significación para la diferencia entre las hembras a la dispersión de los datos. También se encontró un incremento en la sensibilidad al dolor en las hembras (pero no en los machos) alojados conjuntamente y tratadas con  $\beta$ -FNA al nacimiento frente a las inyectadas con vehículo (un 33% de descenso en la latencia de respuesta,  $p < 0,05$ ). No se encontró un efecto aditivo o sinérgico para el aislamiento sexual y la  $\beta$ -FNA. Es más, en las ratas hembras la combinación de ambos tratamientos redujo el efecto hiperalgésico encontrado para la  $\beta$ -FNA y el aislamiento sexual por separado. En los machos no se encontraron diferencias significativas en los animales inyectados con  $\beta$ -FNA respecto a sus correspondientes controles con vehículo. Aunque en estos grupos tratados con  $\beta$ -FNA no fueron significativas las diferencias entre los aislados y los alojados conjuntamente, los aislados sexualmente todavía difirieron significativamente de los controles para los dos tratamientos ( $p < 0,05$ ). En los animales de 14 días el aislamiento redujo la sensibilidad al dolor en los machos inyectados con vehículo (con un incremento en las latencias del 50%,  $p < 0,01$ ) (Fig. 15b) y la incrementó en las hembras (un descenso en las latencias del 27%), aunque en estas últimas el efecto no alcanzó significación

( $p=0,09$ ). El tratamiento con  $\beta$ -FNA al día 7 no tubo efecto a los 14 días *per se*, pero revirtió el efecto del aislamiento sexual.



#### IV.1.2.3 GRÁFICAS Y TABLAS

## Día 1: efectos 24h tras la inyección de $\beta$ -FNA

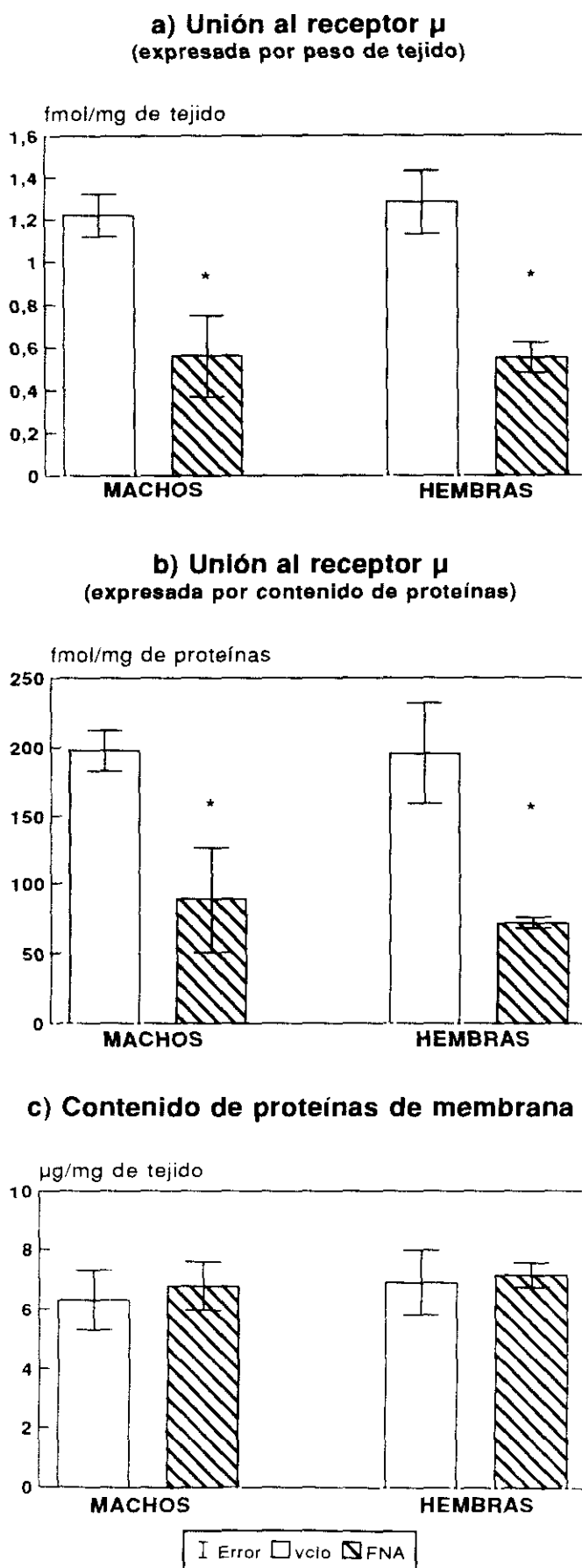


FIG. 9. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 3-4 mediciones. \* $p < 0,05$  frente al grupo control correspondiente (prueba t de student)

## Día 8: efectos tras la inyección con $\beta$ -FNA

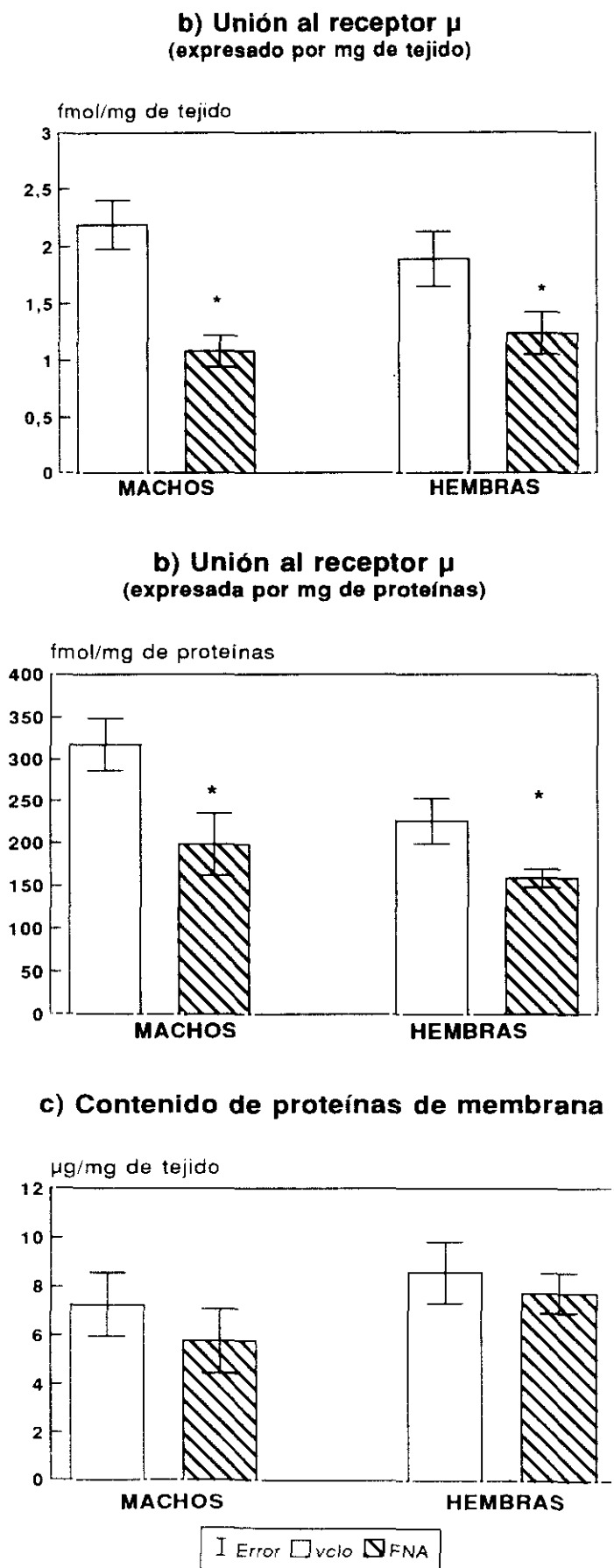
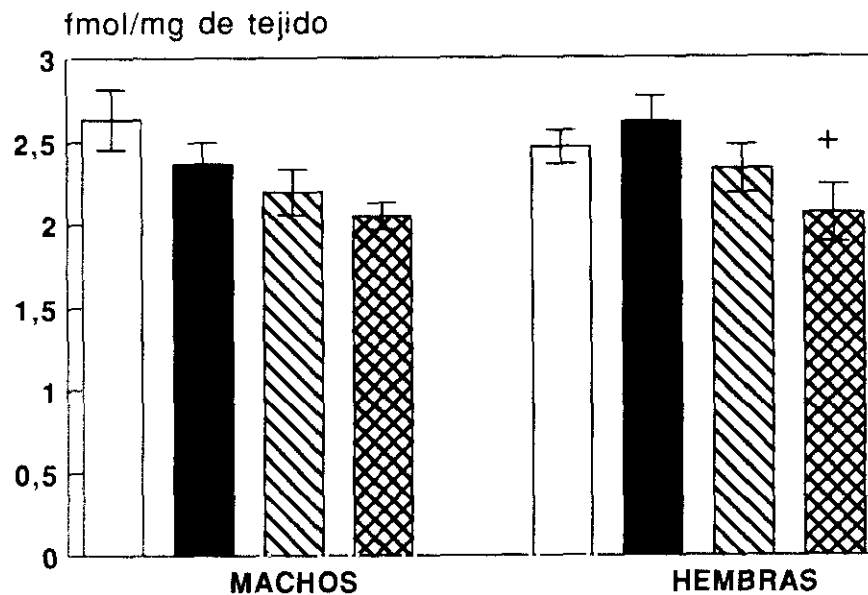


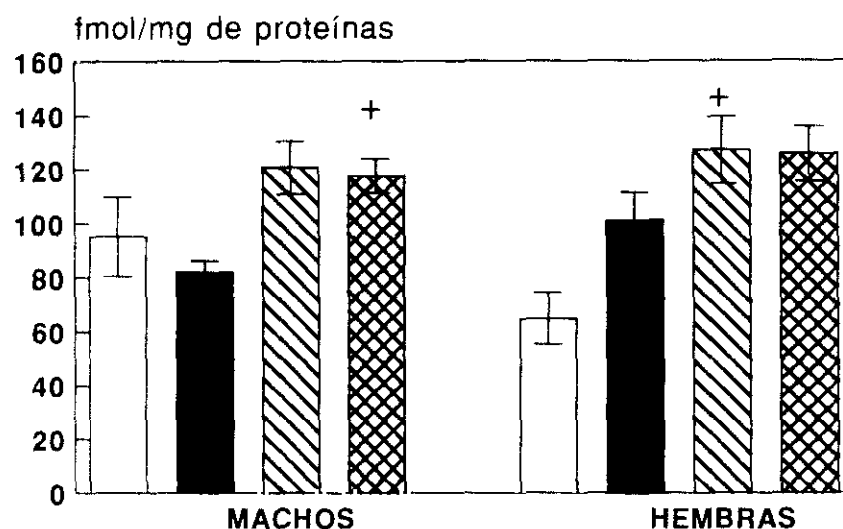
FIG. 10. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 3-4 mediciones. \* $p < 0,05$  frente al grupo control correspondiente (prueba t de student)

# **Efectos del aislamiento sexual y de la $\beta$ -FNA al día 0 sobre el receptor $\mu$ en ratas de 7 días de edad**

## **a) Unión al receptor $\mu$ (expresada por peso de tejido)**



## **b) Unión al receptor $\mu$ (expresada por contenido de proteínas)**



Error
  Conjun vclo
  Aisex vclo
  Conjun FNA
  Aisex FNA

FIG. 11. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 4 mediciones. El aislamiento sexual se efectuó desde el nacimiento y la  $\beta$ -FNA se administró al día 0. + $p < 0,05$  efecto de la FNA sobre los animales con la misma condición de alojamiento (prueba de Duncan)

## Efectos del aislamiento sexual y la $\beta$ -FNA en ratas de 7 días de edad

### Contenido de proteínas de membrana

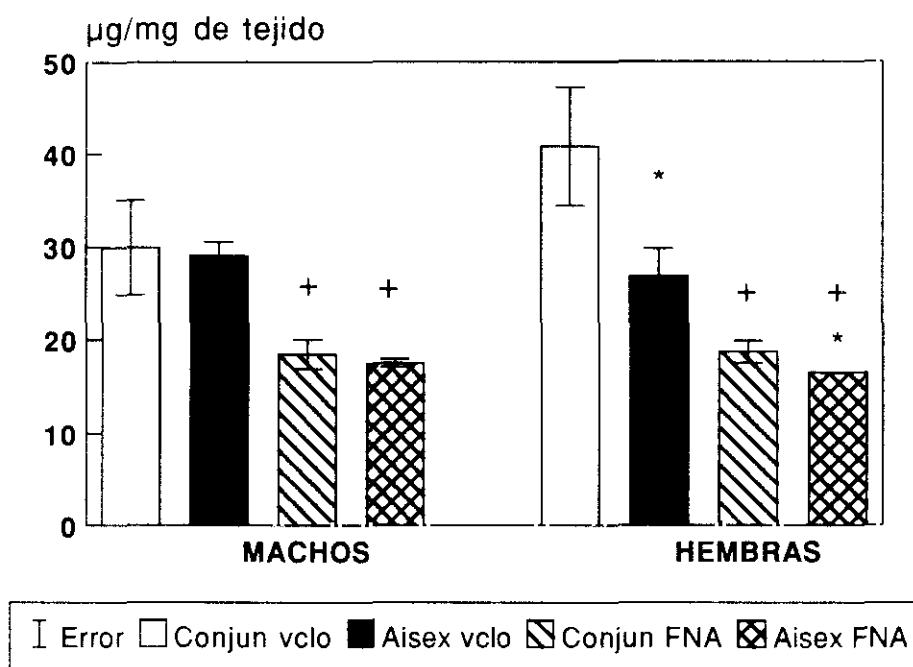
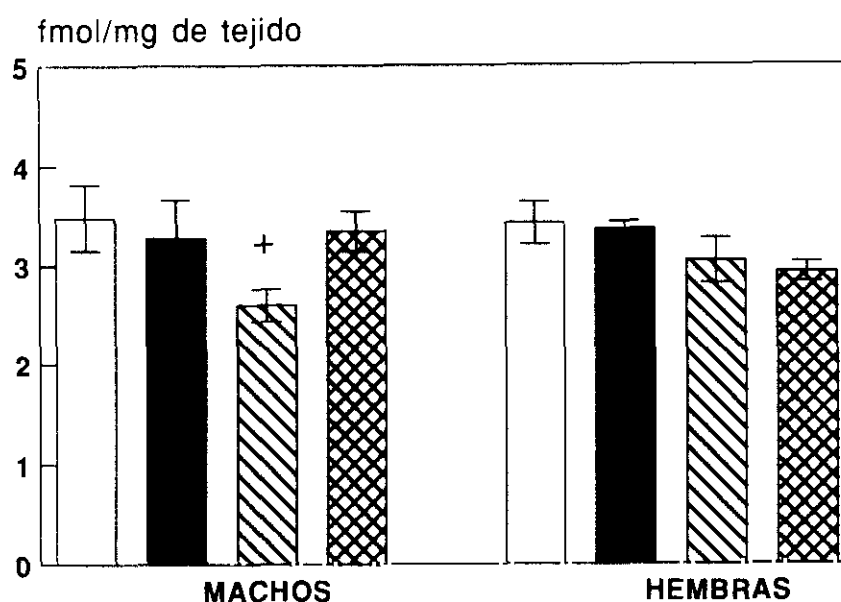


FIG. 12. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 4 mediciones. El aislamiento sexual se efectuó desde el nacimiento y la  $\beta$ -FNA se administró al día 0. + $p < 0,05$  efecto de la FNA sobre los animales con la misma condición de alojamiento; \* $p < 0,05$  efecto del aislamiento sexual sobre los animales con el mismo tratamiento de inyección (prueba de Mann-Whitney)

## Efectos del aislamiento sexual y de la $\beta$ -FNA al día 7 en ratas de 14 días de edad

### a) Unión al receptor $\mu$ (expresada por peso de tejido)



### b) Unión al receptor $\mu$ (expresada por contenido de proteínas)

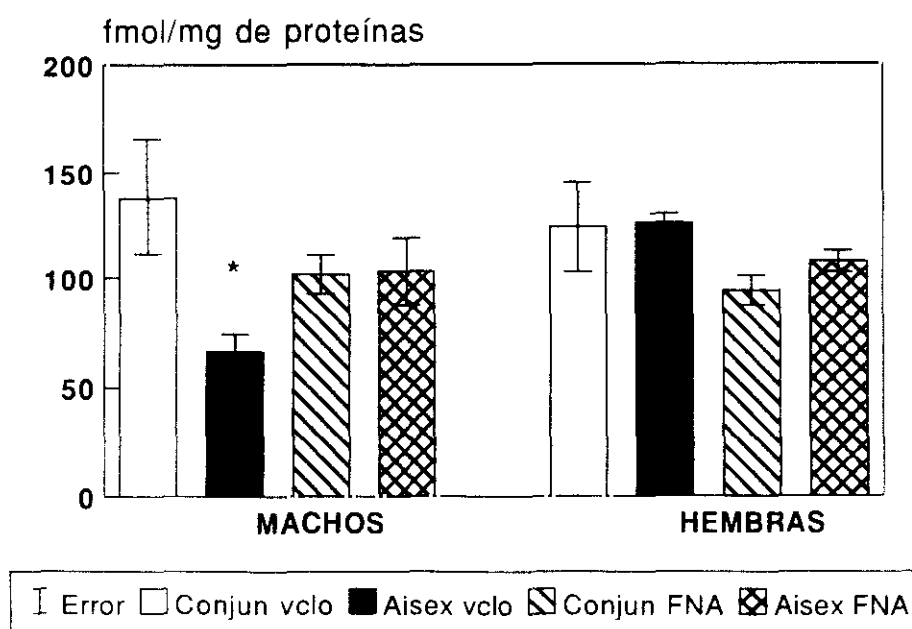


FIG. 13. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 4 mediciones. El aislamiento sexual se efectuó desde el nacimiento y la  $\beta$ -FNA se administró al día 7. <sup>+</sup>p<0,05 efecto de la FNA sobre los animales con la misma condición de alojamiento; <sup>\*</sup>p<0,05 efecto del aislamiento sexual sobre los animales con el mismo tratamiento de inyección

## Efectos del aislamiento sexual y la $\beta$ -FNA en ratas de 14 días de edad

### Contenido de proteínas de membrana

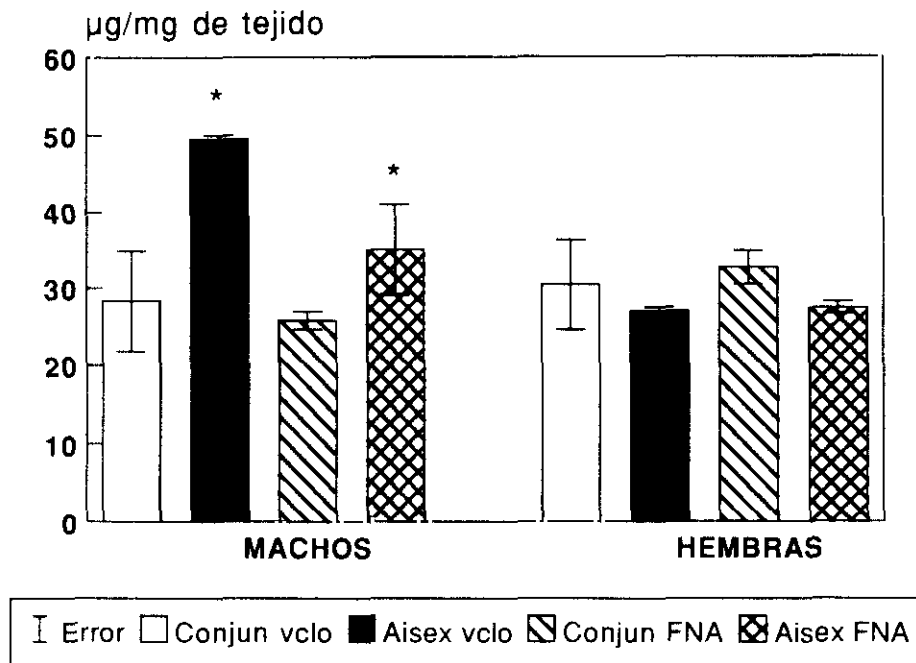


FIG. 14. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 4 mediciones. El aislamiento sexual se efectuó desde el nacimiento y la  $\beta$ -FNA se administró al día 7. \* $p < 0,05$  efecto del aislamiento sexual sobre los animales con el mismo tratamiento de inyección (prueba de Mann-Whitney)

**TABLA 6**

AFINIDAD DE LA UNIÓN AL RECEPTOR $\mu$ EN EL ENCÉFALO TRAS TRATAMIENTO NEONATAL CON $\beta$ -FNA (Constante de disociación ( $K_d$ ) del [ $^3$ H] DAMGO expresada en nM)				
	VEHÍCULO		$\beta$ -FNA	
	♂	♀	♂	♀
7 días				
CONJUN	$0,75 \pm 0,14$	$0,60 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,14$
AISEX	$0,66 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,08$	$0,65 \pm 0,06$	$0,98 \pm 0,10$
14 días				
CONJUN	$0,70 \pm 0,08$	$0,54 \pm 0,06$	$0,84 \pm 0,12$	$0,87 \pm 0,20$
AISEX	$0,94 \pm 0,14$	$0,55 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,15$	$0,63 \pm 0,05$

**TABLA 7**

PESO DEL ENCÉFALO TRAS TRATAMIENTO NEONATAL CON $\beta$ -FNA (g)				
	VEHÍCULO		$\beta$ -FNA	
	♂	♀	♂	♀
7 días				
CONJUN	$0,79 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,05$	$0,76 \pm 0,05$
AISEX	$0,76 \pm 0,01$	$0,74 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,01$
14 días				
CONJUN	$1,33 \pm 0,02$	$1,26 \pm 0,01$	$1,26 \pm 0,01$	$1,21 \pm 0,02$
AISEX	$1,31 \pm 0,01$	$1,28 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,15$	$1,29 \pm 0,03$

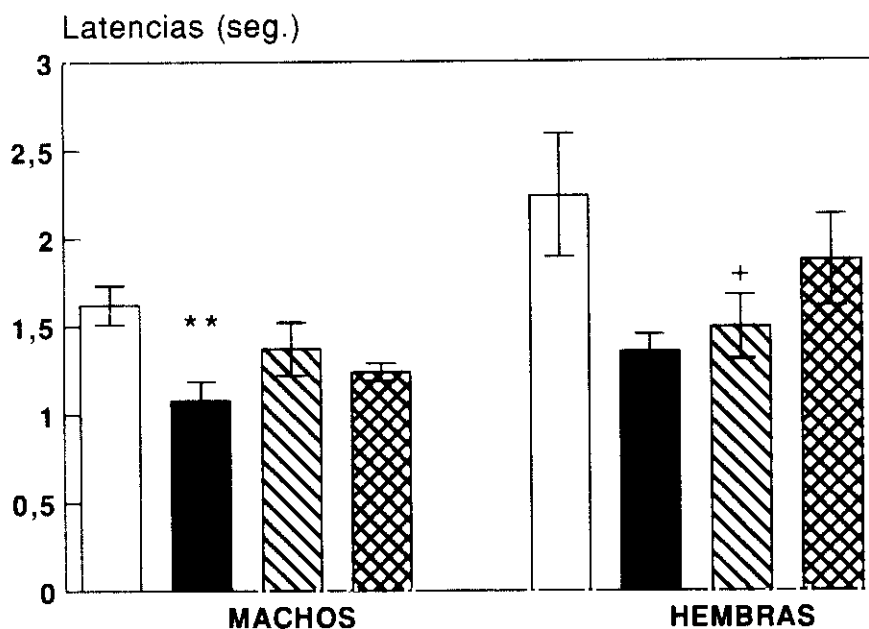
Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 4 mediciones. La  $\beta$ -FNA se administró al día 0 para los animales de 7 día y al día 7 para los animales de 14 días de edad.



# Efectos del aislamiento sexual y al $\beta$ -FNA

## Prueba de inmersión de la cola (adaptada)

a) Día 7



b) Día 14

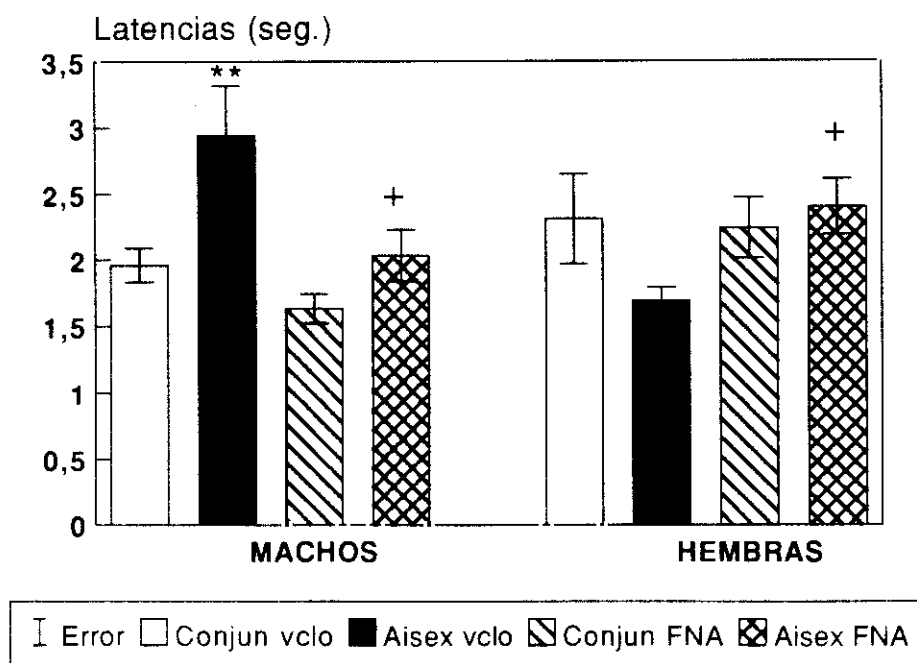


FIG. 15. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 10-20 observaciones. El aislamiento sexual se efectuó desde el nacimiento y la  $\beta$ -FNA se administró a) al día 0; b) al día 7. + $p < 0,05$  efecto de la  $\beta$ -FNA sobre los animales con la misma condición de alojamiento; \*\* $p < 0,01$  efecto del aislamiento sexual sobre los animales con el mismo tratamiento de inyección (prueba U de Mann-Whitney)

#### IV.1.2.4 DISCUSIÓN

Tanto en los tejidos aislados como *in vivo* la  $\beta$ -FNA causa un efecto agonista  $\kappa$  reversible seguido de un antagonismo prolongado de los receptores  $\mu$  al producir una reacción de alquilación sobre los mismos (Takemori y col. 1981; Ward y col. 1982ab), aunque algunos investigadores han sugerido que los receptores  $\delta$  también serían bloqueados por este fármaco (Hayes y col. 1985). La mayoría de los estudios en la edad adulta muestran un antagonismo de la  $\beta$ -FNA que se hace totalmente evidente a las 24hr de ser administrado por vías central o parenteral (Hayes y col. 1986; Ward y col. 1982b) y persiste hasta 6 días, tal como se evidencia por una reducción en la potencia antinociceptiva de la morfina (agonista opioide general). Se ha visto en algunos trabajos en la edad adulta que este efecto va acompañado de una depresión en el número de sitios de unión  $\mu$  en diferentes regiones encefálicas, aunque la extensión de este descenso es variable. Así, la inyección intracerebroventricular de  $\beta$ -FNA produce un descenso del 10% en el tálamo, pero no en el caudado ni en la sustancia gris central (Adams y col. 1987) y del 46% y 89% en el hipotálamo y cuerpo estriado respectivamente (Arjune y col. 1990). En ratones la  $\beta$ -FNA administrada por el mismo procedimiento también disminuye (en un 60%) la unión a sitios  $\mu$  en membranas de sustancia gris periacueductal (Sánchez-Blázquez y Garzón 1989), e inyectada en el cuerpo estriado de rata produce la supresión de la unión autorradiográfica (Morris y col. 1988). También la administración subcutánea de este fármaco (100mg/Kg) en ratones adultos hace disminuir la unión de [ $^3$ H]morfina a membranas de encéfalo entero (Ward y col. 1985). Sin embargo, en otros trabajos con ratas

adultas no se ha encontrado un descenso en la capacidad de unión máxima en el encéfalo entero, pero sí posibles cambios en la afinidad del receptor (Rothman y col. 1988, 1990). Nuestros datos muestran un marcado descenso en la unión a los sitios  $\mu$  24h tras la administración de  $\beta$ -FNA al nacimiento o en el día 7, lo que estaría en concordancia con los resultados de los trabajos mencionados en primer lugar, incluso la magnitud del descenso. Estos resultados representan la primera evidencia de que la  $\beta$ -FNA inyectada subcutáneamente puede acceder y unirse a los receptores  $\mu$  en el encéfalo a estas tempranas edades en la rata. Es de destacar que en las hembras de 8 días tratadas con  $\beta$ -FNA 24hr antes se produjo una menor depresión en la unión a sitios  $\mu$  que en los machos. El tipo de metodología empleado para llegar a esta conclusión es similar al utilizado por otros autores (Pasternak y col. 1980). Aunque el efecto depresor de la administración de  $\beta$ -FNA al nacimiento se redujo considerablemente una semana más tarde, todavía se encontró un descenso significativo en la unión a sitios  $\mu$  en los machos de 14 días alojados conjuntamente inyectados con  $\beta$ -FNA al día 7.

El aislamiento sexual tuvo unos efectos sobre el contenido total de proteínas de las membranas celulares en el encéfalo entero que fueron distintos dependiendo de la edad y el sexo de los animales. Una sola inyección de  $\beta$ -FNA al nacimiento causó una caída en el contenido de proteínas cuando se midió una semana más tarde (pero no a las 24hr) que fue pronunciado tanto en los grupos aislados sexualmente como en los que estuvieron alojados conjuntamente machos y hembras. Este efecto es crítico para la administración temprana de  $\beta$ -FNA puesto que no se observa una semana después del tratamiento con  $\beta$ -

FNA al día 7, y además no parece manifestarse de forma inmediata dado que no apareció durante el bloqueo agudo. Otros autores han encontrado que el tratamiento crónico con  $\beta$ -FNA desde el nacimiento a la tercera semana no altera los pesos corporal, del encéfalo y de algunos órganos periféricos (Zagon y McLaughlin 1986a). En nuestro trabajo se confirma la falta de efecto en el peso del cerebro y, así, la acción de la  $\beta$ -FNA podría tener lugar sobre una proteína específica del nacimiento en vez de representar una acción no específica. Sin embargo, parece claro que la alteración resultante se produce sobre proteínas que no son, al menos en su totalidad, receptores opioides.

Otros autores han encontrado que el tratamiento crónico con agonistas (morfina,  $\beta$ -endorfina) o antagonistas generales y reversibles (naloxona, naltrexona) alteran el desarrollo de los receptores opioides particularmente las primeras semanas de vida postnatal (Bardo y col. 1983; Tempel y col. 1988; McDowell y Kitchen 1987; Zadina y col. 1985). Es más parece haber un acuerdo general en que se trata de un período de plasticidad única para este sistema, durante el cual los receptores opioides se encuentran en rápido desarrollo ontogenético (Bardo y col. 1983; Sirinathsinghji y col. 1985; Tsang y Ng 1980) que coincide también con un período de desarrollo de sus ligandos endógenos (McDowell y Kitchen 1987; Tsang y col. 1982ab). Así, se ha observado que el tratamiento diario con naloxona (1mg/Kg) durante tres semanas produce un incremento en el número de receptores opioides en diversas regiones encefálicas en ratas neonatales (Bardo y col. 1982, 1983), mientras que en los animales adultos, con la misma dosis, no tiene efecto (Bardo y col. 1983), aunque sí se producen elevaciones en estos animales con dosis

mayores de naloxona (10mg/Kg) durante cuatro semanas (Lahti y Collins 1978). Más aún, se ha observado que la administración tanto aguda como crónica de morfina es capaz de reducir el número de receptores  $\mu$  en encéfalo entero durante la primera semana de vida, pero no en edades posteriores (Tempel y col. 1988) y la administración diaria de  $\beta$ -endorfina durante la primera semana de vida produce un descenso del número de receptores  $\mu$  y  $\delta$  en diversas áreas encefálicas (Zadina y col. 1985). Por contra, otros autores han encontrado que la administración de morfina produciría una elevación del número de receptores  $\mu$  en el estriado y núcleo accumbens de las ratas neonatales, mientras que en otros trabajos no han encontrado cambios (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987). Por lo que se refiere a los resultados sobre los receptores  $\mu$  en nuestro trabajo, parece que la  $\beta$ -FNA *per se*, tendría siempre un efecto depresor de su número absoluto en las membranas neuronales del encéfalo entero. Dicho efecto parece especialmente marcado cuando se mide a los 14 días en los machos alojados conjuntamente a los que se administró al día 7. Nuestros resultados confirman la sensibilidad del sistema opioide a los tratamientos farmacológicos hacia él dirigidos durante las primeras semanas postnatales. Los efectos de la  $\beta$ -FNA sobre los receptores  $\mu$  no coinciden con los previamente mencionados aumentos observados para los antagonistas reversibles en el período neonatal (Bardo y col. 1982, 1983) y en algunos casos en los adultos (Lahti y Collins 1978). Conviene recordar, no obstante, que en estos trabajos se trataba de un tratamiento crónico, mientras que en nuestro caso los efectos se obtuvieron con una única inyección del antagonista. Nuestras observaciones sí concuerdan, en cambio, con la disminución en los sitios de unión descritos en animales adultos para la propia  $\beta$ -FNA (Adams y col. 1987;

Arjune y col. 1990; Morris y col. 1988; Sánchez-Blázquez y Garzón 1989). Esto podría ser una indicación de los complejos mecanismos implicados en el recambio de los receptores unidos irreversiblemente a la  $\beta$ -FNA, algo que ya ha sido sugerido por otros autores (Rothman y col. 1990). Otra cuestión interesante es el hecho de la persistencia encontrada en nuestro estudio del efecto depresor de la  $\beta$ -FNA sobre los receptores  $\mu$ . En animales adultos se considera que la tasa de recambio de los receptores opioides es de 3 días (Caruso y col. 1980; Rothman y col. 1990); sin embargo, nosotros hemos visto que los efectos de la  $\beta$ -FNA son todavía evidentes una semana después de su administración. Como posible explicación, aparte de la ya mencionada complejidad propuesta para la unión de este fármaco, es de señalar que se ha propuesto que, si bien los mecanismos de internalización de los receptores podrían estar maduros al nacimiento, los procesos de reciclado no estarían totalmente desarrollados hasta la tercera semana postnatal (Tempel y col. 1988).

El aislamiento sexual como tal no llegó a tener un efecto significativo sobre los receptores, pero se apuntó un pequeño efecto aditivo al de la  $\beta$ -FNA a los 7 días en los dos sexos. Además, parece revertir el efecto de la  $\beta$ -FNA al día 14 en los machos. El cómo podría producirse esta compensación parece difícil de explicar. Sin embargo es interesante señalar a este respecto la observación de que las ratas presentan durante las dos primeras semanas de vida una respuesta hipersecretora de  $\beta$ -endorfina (péptido opioide endógeno) al estrés (Iny y col. 1987). Así, existiría la posibilidad de que la reacción psicológica al aislamiento sexual hubiera modificado de algún modo la liberación de los ligandos

opioides endógenos, efecto que ya ha sido postulado para el aislamiento social en ratones (Puglisi-Allegra y Oliverio 1983). Los animales del grupo correspondiente son inyectados con  $\beta$ -FNA al día 7 llevan una semana bajo la condición de aislamiento sexual, es posible que un hipotético tono opioide modificado (posiblemente aumentado) pudiera interferir de algún modo con los efectos de la  $\beta$ -FNA sobre el receptor  $\mu$ . De hecho, otros autores han postulado que los opiodes liberados en respuesta al estrés de constreñimiento afectarían a la unión de la  $\beta$ -FNA al receptor  $\mu$  (Adams y col. 1987). A este respecto cabría señalar que el efecto antinociceptivo encontrado en los machos aislados sexualmente a los 14 días (antagonizado por el tratamiento con  $\beta$ -FNA al día 7) apoyaría, hasta cierto punto, la idea de la existencia de una posible elevación de la actividad opioide en este grupo experimental.

Cuando el resultado de los niveles de receptores se expresa frente a la concentración de proteínas se manifiestan en este parámetro los efectos de los dos tratamientos sobre los propios niveles de proteínas, complicando la interpretación de la unión máxima por mg de proteínas, que no sería ya una simple estimación del *número de receptores*. Podría tener interés en la medida en que se puede tomar como indicación de la proporción en que aparece el receptor  $\mu$  frente al resto de proteínas de membrana, entre las que se encuentran también receptores y enzimas de otros sistemas. En cualquier caso cabe poner de manifiesto una vez más, como ya apuntábamos en la primera parte de este estudio (ver sección IV.1.2.3), la importancia de analizar los datos del contenido de proteínas antes de referir otra variable a este parámetro, especialmente cuando se trata de

trabajos en el desarrollo en los que los individuos pueden ser particularmente sensibles a los tratamientos de forma no prevista por el experimentador.

En contraste con lo encontrado en la primera parte de este estudio (apartado IV.1.1) el aislamiento sexual no tuvo, por sí mismo, efecto sobre la capacidad de unión a receptor  $\mu$  por mg de tejido al día 14. La explicación de este fenómeno podría estar en la posible existencia de diferencias interindividuales o intercamada a la hora de reflejar los efectos del aislamiento en el número de receptores. Es posible que el aislamiento sexual suponga una situación psicológica compleja ante la cual los individuos podrían reaccionar de forma diversa. Además, las interacciones con los otros hermanos, y, muy especialmente con la madre (que además pueden afectar a las respuestas del eje hipofisario-adrenal y comportamental en ambos casos) (File 1978a; Hofer 1975; Meaney y col. 1985; Randall y Campbell 1976; Smotherman 1983; Vázquez y Akil 1992; Villescas y col. 1977; Vogt y col. 1983), son con alta probabilidad agentes importantes en los efectos del aislamiento sexual (Alleva y col. 1986. 1989). En relación con esto, se ha descrito que la respuesta comportamental de un animal ante la prueba de campo abierto varía dependiendo de cómo responde otro que realice la prueba con él (Gervais 1978). La diferente forma en que podrían ser afectados estos distintos componentes podría hacer de factor multiplicador de las diferencias al dar lugar a una diversidad de situaciones sociales dentro de lo que estábamos considerando una sola condición de aislamiento sexual, con lo que podría aparecer una mayor variabilidad en los efectos detectados. De hecho, en nuestro trabajo sí encontramos una reducción bastante clara de la unión a receptor  $\mu$  en los datos



provinientes de dos de las camadas empleadas. No es posible tratar estadísticamente tan pequeño número de datos, pero este hallazgo podría apoyar la posible variación postulada para los efectos del aislamiento sexual sobre el receptor  $\mu$ . Quizá también una pequeña diferencia en el ritmo de desarrollo entre las camadas podría ser crítica para algunos efectos de este tratamiento. En este sentido es sabido que, por ejemplo las ratas no alcanzan la pubertad justo a los mismos días a partir de su nacimiento, sino que existe un margen de variación (Illera y col. 1991; catálogo IFFA-CREDO 1992). Es más, nosotros mismos, en otro apartado de esta Tesis Doctoral, hemos encontrado un diferente efecto del tratamiento con naltrexona sobre los sistemas monoaminérgicos a los 14 días edad, atribuible posiblemente a diferencias interindividuales o intercamada (ver apartado IV.2.2). El efecto encontrado sobre las proteínas de membrana podría ir en la línea de posibles modificaciones en otros sistemas (quizá sobre otros receptores) en esta segunda parte del trabajo; de hecho, hay evidencias farmacológicas de que el aislamiento sexual podría tener efectos sobre el receptor de GABA-benzodiazepinas (Laviola y Loggi, 1992) y el aislamiento social neonatal modifica la tasa de recambio de serotonina en el encéfalo de rata (Spear y Scalzo 1985).

El aislamiento sexual afectó muy apreciablemente a las latencias nociceptivas en las dos edades estudiadas. En las hembras el aislamiento tiende a producir hiperalgesia en los grupos inyectados con vehículo tanto a 7 como a 14 días, mientras que en los machos el efecto es de hiperalgesia al día 7 y antinociceptivo a día 14. El distinto efecto del aislamiento sexual encontrado para los machos inyectados con vehículo a los 7 y 14 días

podría explicarse en un contexto de cambios compensatorios que sucederían durante este período de especial plasticidad. Fenómenos similares han sido encontrados por otros autores para otras variables (Bardo y col. 1983; Rodríguez de Fonseca y col. 1992; Tempel y col. 1988; Zadina y col. 1985). La  $\beta$ -FNA inyectada al nacimiento tuvo a los 7 días un efecto hiperalgésico en las hembras alojadas conjuntamente, mientras que en las hembras aisladas compensó la tendencia también hiperalgésica del aislamiento sexual. Parecería, pues, que la acción combinada de ambos tratamientos, lejos de ser aditiva o sinérgica, sería compensatoria en las hembras de 7 días. Este fenómeno sería además exclusivo de las hembras de esta edad, ya que en los machos la  $\beta$ -FNA no tuvo efecto ni en los aislados ni en los alojados conjuntamente y no parece suprimir el efecto del aislamiento. Cabe mencionar que se ha encontrado en estudios anteriores que el aislamiento sexual desde el nacimiento influiría en los efectos antinociceptivos de fármacos de tipo benzodiazepinas en los ratones hembras (pero no en los machos) en la edad adulta (Laviola y Loggi. 1992). A los 14 días la  $\beta$ -FNA inyectada al día 7 no tuvo efecto *per se* pero revirtió los efectos del aislamiento en los animales de los dos sexos. Estos resultados sugieren la posibilidad de que el aislamiento sexual altere los sistemas opioides endógenos en el período neonatal y que el antagonizar el receptor  $\mu$  pueda contrarrestar este efecto. Es interesante señalar en este punto que en el único trabajo disponible sobre acciones de fármacos opioides sobre la nocicepción en animales aislados sexualmente se observó que el aislamiento potenciaba el efecto antinociceptivo de la administración aguda de morfina en ratones machos de 40 días (Alleva y col. 1986).

Con respecto a la falta de una correlación muy clara entre los resultados de nocicepción y los de unión a receptor, debe recordarse que la percepción del dolor está modulada de forma compleja (Alleva y col. 1986; Beitz 1992; Goicoechea 1991, Tesis de Licenciatura; Iggo y col. 1985; Jordan y Oehme 1985; Wiesenfeld-Hallin y Xu 1992) y no puede explicarse tan sólo en términos de receptores  $\mu$ . El aislamiento sexual podría haber alterado otros subtipos de receptores opioides, o inducido cambios en la liberación de opioides endógenos; de hecho es conocido que las relaciones sociales pueden influir sobre la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (para revisión ver Levine y col. 1991b; Pancheri y Bressa 1990; Stanton y col. 1988; Vázquez y Akil 1992) en el que interviene la  $\beta$ -endorfina (para revisión en relación con la analgesia ver Lewis 1986; Lewis y col. 1980). Más aún, no podría excluirse una acción sobre sistemas no opioides también implicados en la percepción del dolor. Así, se ha sugerido muy claramente la implicación del sistema GABAérgico en los efectos del aislamiento sexual sobre los mecanismos nociceptivos en la edad adulta (Laviola y Loggi 1992). Además, se ha visto que, por ejemplo el sistema serotoninérgico ejercería una acción antinociceptiva tónica en las crías de rata de 6 días y que el aislamiento social a esta edad produciría analgesia reversible por antagonistas de serotonina y naloxona (Spear y col. 1985; Enters y Spear 1988) y que los sistemas opioide y serotoninérgico interactúan para regular la nocicepción en ratas de esta edad (Enters y Spear 1988). De forma similar, y como mencionábamos al principio, la  $\beta$ -FNA podría tener un efecto, más o menos indirecto o diferido a través de posibles repercusiones ulteriores, sobre otros sistemas. De hecho, las variaciones inducidas por ambos tratamientos sobre los niveles de proteínas de membrana podrían constituir un

apoyo indirecto a esta interpretación.

Desde un punto de vista metodológico, este estudio es el primero en establecer un intervalo óptimo de temperaturas para la prueba de inmersión de la cola en agua caliente en ratas neonatales (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987). Este ajuste es particularmente recomendable en las edades tempranas del desarrollo postnatal, en las que una temperatura excesiva del agua puede dar lugar a que las respuestas obtenidas sean difíciles de medir y producir un innecesario sufrimiento extra al animal neonato. Las consecuencias de esta adaptación introducida en el estímulo térmico empleado han sido altamente satisfactorias ya que nos han permitido detectar numerosas diferencias debidas a los tratamientos incluso al día 7, y apreciar un distinto efecto del aislamiento sexual en machos y hembras al día 14, un resultado que no pudimos encontrar cuando se empleó un temperatura fija no específica para cada edad.

Esta segunda parte del trabajo presenta también la originalidad de haber estudiado, en paralelo y en ambos sexos, los efectos de dos tratamientos de distintas características - uno social y otro farmacológico- lo cual representa una novedad en este campo. Ello nos ha permitido observar algunos efectos distintos según el sexo para los dos tratamientos en las respuestas nociceptivas, el contenido de proteínas de membrana y, en cierta medida, también sobre la capacidad de unión máxima a receptor  $\mu$  en la segunda semana postnatal.

Podría afirmarse, en conclusión, que el aislamiento sexual en el período neonatal

y el antagonismo del receptor  $\mu$  individualmente causan algunas disfunciones del sistema opioide endógeno y combinadamente pueden compensar sus efectos en algunos casos, pero nunca producen una perturbación sinérgica del desarrollo del sistema opioide y la nocicepción. Los efectos de ambos tratamientos sobre la percepción del dolor son claramente dependientes tanto del sexo como de la edad. El bloqueo irreversible del receptor  $\mu$  al nacimiento produce una depresión del contenido de proteínas en las membranas celulares del encéfalo entero una semana después de una sola administración de  $\beta$ -FNA, lo que sugiere que el uso de este compuesto en neonatos puede producir efectos no relacionados con el antagonismo del receptor  $\mu$ .

## IV.2 INTERACCIONES SOE-SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS: TRATAMIENTO CON NALTREXONA

[Los niveles de significación especificados entre paréntesis en las siguientes secciones corresponden a los resultados del análisis de varianza (salvo cuando se indique otra cosa). La significación para la prueba *post-hoc* de Duncan se fijó en  $p < 0,05$ ) (ver sección III.6.2 sobre *Análisis estadístico*)]

### IV.2.1 EFECTOS A LOS 7 DÍAS DE EDAD

El análisis de varianza reveló diferencias significativas debidas al tratamiento para la concentración de HVA ( $p < 0,05$ ) en el cuerpo estriado así como para la tasa de recambio HVA/DA ( $p < 0,01$ ). En ambos casos los animales tratados presentaron mayores valores que los controles (♂ 22%, ♀ 25%, para el HVA y ♂ 33%, ♀ 17% para la tasa HVA/DA) (Tabla 8, Fig.16). Ni las diferencias sexuales, ni la interacción tratamiento x sexo fueron significativas. El análisis *post-hoc* no encontró significación para diferencias entre los grupos para la concentración de HVA, lo que indicaría que se trata de un efecto general que solamente alcanza la significación estadística al considerar conjuntamente machos y hembras. En cuanto al índice HVA/DA, la prueba de Duncan sólo reveló como significativas las diferencias entre los machos tratados y controles. Sin embargo, las hembras tratadas también presentan mayores tasas HVA/DA. Por ello y al no existir interacción tratamiento x sexo, no se podría afirmar que exista un efecto distinto según el

sexo. No aparecieron diferencias significativas debidas al tratamiento, sexo o a la interacción, ni para el contenido de DA ni de DOPAC, y, consecuentemente, tampoco para el índice DOPAC/DA.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al tratamiento ni a la interacción tratamiento x sexo, para el sistema serotoninérgico en ninguna de las áreas encefálicas estudiadas (Tabla 9). Sólo se encontraron diferencias sexuales significativas en cuanto a la concentración de 5-HIAA en mesencéfalo ( $p < 0,05$ ), presentando los machos mayores niveles que las hembras. El análisis de Duncan sólo encontró significativa la diferencia entre los machos controles y las hembras tratadas, pero todo indica que se trata de una diferencia general. Las diferencias sexuales para el cociente 5-HIAA/5-HT no fueron significativas ( $p = 0,06$ ), posiblemente debido a que los machos presentan mayores valores de 5-HT que las hembras, aunque esta diferencia no alcance significación estadística ( $p = 0,06$ ).

#### IV.2.2 EFECTOS A LOS 14 DÍAS DE EDAD

- Subpoblaciones

Con respecto al tratamiento, a esta edad encontramos dos subpoblaciones en las que el efecto de la naltrexona fue diferente. Una de ellas (que desde ahora denominaremos A) contó con 17 individuos (5 machos y 12 hembras), provenientes de dos camadas distintas,

y la segunda (subpoblación *B*) se compuso de 8 individuos (6 machos y 2 hembras) de una misma camada. Estas dos subpoblaciones de animales tratados (machos y hembras conjuntamente) difirieron significativamente para la práctica totalidad de los parámetros, en todas las regiones estudiadas, al analizar las medias con la prueba de *t* de Student. En concreto, la subpoblación *B* presentó valores significativamente mayores que la subpoblación *A* para las concentraciones de DA y HVA y el índice HVA/DA estriatales (Tabla 10) y las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en las tres estructuras, así como para las tasas de recambio 5-HIAA /5-HT en estriado y mesencéfalo (con una significación  $p < 0.0001$  en todos los casos) (Tabla 11). La subpoblación *B* mostró valores significativamente menores que la subpoblación *A* para la concentración de DOPAC ( $p < 0.05$ ) y el índice DOPAC/DA ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 10). Únicamente no difirieron en la tasa 5-HIAA/5-HT en hipotálamo (Tabla 11), por ser las diferencias en 5-HT y 5-HIAA en el mismo sentido y de similares proporciones. La magnitud de las variaciones cuando la subpoblación *B* presentó mayores valores que la subpoblación *A* osciló entre el 48% y el 322% para los neurotransmisores, entre 57%-379% para sus metabolitos (siendo siempre mayor la diferencia entre las concentraciones de los metabolitos) y entre 21%-63% para las tasas de recambio. En el caso en que la subpoblación *B* presentó menores valores que la subpoblación *A* las diferencias fueron del 19% para el DOPAC y del 47% para el índice DOPAC/DA.

Una vez establecidas las diferencias entre las subpoblaciones de animales tratados se procedió a analizar, por separado, el efecto del tratamiento con naltrexona en cada una



de ellas:

- Efectos en la subpoblación A

Los animales tratados de esta subpoblación mostraron diferencias significativas frente a los controles para todos los parámetros estudiados referentes al sistema dopaminérgico en el cuerpo estriado ( $p < 0,001$  para la DA,  $p < 0,01$  para el DOPAC y  $p < 0,0001$  para HVA y los índices DOPAC/DA y HVA/DA). En el caso de la concentración de DA, los animales tratados presentaron menores valores que los controles (Tabla 12). Aunque la prueba de Duncan sólo consideró significativa la diferencia entre los grupos de hembras, los machos tratados también muestran esta misma tendencia (valores un 21% más bajos los machos tratados que los controles y 25% las hembras tratadas frente a las controles). En cuanto a la concentración de DOPAC, se obtuvieron mayores niveles para los animales tratados ( $\sigma$  24% y  $\text{♀}$  37%), siendo sólo significativa la diferencia entre hembras tratadas y controles, según el análisis *post-hoc*. La tasa DOPAC/DA fue significativamente mayor para los animales tratados que en los controles, tanto en los machos como en la hembras (Fig. 17), al converger su mayor contenido en DOPAC con sus menores valores de DA. Los animales tratados con naltrexona, tanto machos como hembras, tuvieron una menor tasa HVA/DA que los controles (Fig. 17), por ser mayor su bajada en HVA frente a los controles que la que se produjo en la concentración de DA. Al aparecer significación en el análisis *post-hoc* tanto en machos como en hembras en cuanto a ambos índices, se corrobora nuestra apreciación anterior de

que el efecto del tratamiento se producía en ambos sexos. Esto está apoyado además por el hecho de que en ninguno de estos parámetros apareció una interacción significativa tratamiento x sexo.

El tratamiento tuvo efecto sobre el sistema serotoninérgico en las tres regiones encefálicas, para todos los parámetros objeto de estudio ( $p < 0,0001$  para 5-HT, 5-HIAA y 5-HIAA/5-HT en estriado y mesencéfalo,  $p < 0,0001$  para 5-HT, 5-HIAA y  $p < 0,05$  para 5-HIAA/5-HT en hipotálamo). En todos los casos esta diferencia supuso un descenso de los valores de las concentraciones o de la tasa de recambio (Tabla 13, Fig. 18). El hecho de que también sea menor el índice 5-HIAA/5-HT se debe a que la bajada en la concentración de 5-HIAA fue siempre mayor que la experimentada por la 5-HT. Las diferencias debidas al tratamiento fueron significativas (según la prueba de Duncan) tanto en los machos como en las hembras para todas las variables estudiadas, con la excepción del índice 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo. En esta zona, aunque la tasa de recambio sufrió descenso en los dos sexos a causa del tratamiento (5% en los machos, 15% en las hembras), el análisis *post-hoc* dió como significativa solamente la diferencia entre las hembras. Al no existir tampoco una interacción tratamiento x sexo, no cabría hablar de un efecto distinto según el sexo, y la falta de significación en los machos podría atribuirse a la dispersión de los datos.

Tampoco se encontraron diferencias sexuales para este sistema ni entre los animales tratados ni entre los controles, ni fue significativa la interacción tratamiento x sexo en ningún caso.

- Efectos en la subpoblación B

Para estas comparaciones se consideraron conjuntamente los machos y las hembras, dado que en la subpoblación B no hay más que dos hembras (que, por otra parte, presentan valores similares a los machos) y en el grupo control tampoco aparecieron diferencias significativas debidas al sexo. Los datos se analizaron mediante la prueba de *t* de Student.

Se encontró un aumento significativo de la concentración de DA estriatal en los animales tratados frente a los controles (un 20%,  $p < 0,05$ ) (Tabla 14). Sin embargo, no aparecieron diferencias significativas en las tasas de recambio DOPAC/DA y HVA/DA. Ello puede ser debido a que, de hecho, las concentraciones de DOPAC y HVA fueron mayores en los animales tratados que los controles (7% y 11%, respectivamente), aunque estas diferencias no alcancen significación estadística.

Por lo que se refiere al sistema serotoninérgico, tanto en mesencéfalo como en hipotálamo, los animales tratados presentaron concentraciones menores de 5-HIAA ( $p < 0,05$  en ambos casos), sin que la 5-HT variara significativamente (Tabla 15). Consecuentemente, los índices 5-HIAA/5-HT fueron también más pequeños en los animales tratados tanto en mesencéfalo como en hipotálamo ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,05$ ; respectivamente). No aparecieron variaciones significativas para estos parámetros en el cuerpo estriado.

#### IV.2.3 EFECTOS A LOS 22 DÍAS DE EDAD

En lo que se refiere al sistema dopaminérgico en el cuerpo estriado, no aparecieron efectos significativos debidos al tratamiento (Tabla 16). Sí tuvo efecto la naltrexona sobre los contenidos de 5-HT ( $p<0,001$ ) y de 5-HIAA ( $p<0,0001$ ) estriatales. En ambos casos el efecto supuso una elevación de los niveles de estos compuestos. La interacción tratamiento x sexo no fue significativa en ninguno de los casos. El análisis *post-hoc* sólo encontró diferencias significativas para la 5-HT entre los machos tratados y controles, aunque en los dos sexos se produce elevación por el tratamiento (un 40% en los machos y 19% en las hembras) (Tabla 17, Fig. 19). Al no existir interacción tratamiento x sexo podría entenderse que el efecto es general, aunque no alcance significación estadística en las hembras, posiblemente debido a un fenómeno de dispersión de datos. El efecto de la naltrexona fue significativo tanto en machos como en hembras para la concentración 5-HIAA (Tabla 17, Fig. 19). El análisis de varianza no encontró diferencias significativas para la tasa de recambio 5-HIAA/5-HT ni respecto al tratamiento (al producirse aumentos tanto en 5-HIAA como en 5-HT), ni para la interacción tratamiento x sexo.

En el mesencéfalo no se encontraron diferencias significativas en cuanto al tratamiento para la 5-HT, pero sí aparecieron mayores valores para los animales tratados en la concentración de 5-HIAA ( $p<0,0001$ ), y, por tanto, también para el índice 5-HIAA/5-HT ( $p<0,05$ ). La interacción tratamiento x sexo no fue significativa para ninguno de los parámetros. El análisis de Duncan reveló como significativo el efecto en los machos

tratados (19% en la concentración de 5-HIAA y 12% en el índice 5-HIAA/5-HT), pero no en las hembras tratadas, aunque también se produce una elevación frente a las controles (9% y 5%, respectivamente) (Tabla 17, Fig 20).

Tampoco en el hipotálamo se observaron variaciones significativas en 5-HT debidas al tratamiento. Sin embargo, el tratamiento con naltrexona -al igual que en mesencéfalo- produjo una elevación de la concentración de 5-HIAA ( $p < 0,0001$ ) que fue significativa tanto en machos como en hembras tratados, según la prueba de Duncan (Tabla 17). En concordancia con estos resultados, se encontraron también unos valores mayores en cuanto a la tasa de recambio 5-HIAA/5-HT ( $p < 0,0001$ ) en los animales inyectados con naltrexona. El análisis *post-hoc* reveló como significativo este efecto tanto en machos como en hembras (Tabla 17, Fig. 20). Consecuentemente con lo expuesto, la interacción tratamiento x sexo no fue significativa en ningún caso.

Se encontraron diferencias sexuales significativas tanto en el contenido de HVA ( $p < 0,05$ ) como en el índice HVA/DA ( $p < 0,0001$ ). En ambos casos los machos -tanto controles como tratados- mostraron valores significativamente mayores que sus correspondientes grupos de hembras. Por lo que se refiere al sistema serotoninérgico, aparecieron diferencias significativas respecto al sexo en los contenidos de 5-HT y 5-HIAA tanto en el mesencéfalo como en el hipotálamo. Con respecto al mesencéfalo, los machos presentaron mayores valores de 5-HT que las hembras ( $p < 0,01$ ), con independencia del tratamiento (que no tuvo efecto significativo). El análisis de Duncan sólo señaló como

significativa la diferencia entre machos tratados y hembras controles. Al no existir un efecto significativo del tratamiento para este parámetro, cabe interpretar que la diferencia sexual es general y que la prueba *post-hoc* ha encontrado significación entre los dos grupos más extremos. También se observaron mayores valores para los machos en la concentración de 5-HIAA mesencefálico ( $p < 0,0001$ ) (11% mayor en los machos controles y 21% en los tratados), aunque esta diferencia sólo fue significativa entre los animales tratados. En el hipotálamo también se encontraron mayores niveles de 5-HT y 5-HIAA para los machos ( $p < 0,01$  y  $p < 0,0001$ ; respectivamente), con independencia del tratamiento, si bien el análisis *post-hoc* sólo indicó como significativas las diferencias entre los grupos controles para la 5-HT y entre los tratados para el 5-HIAA. La tasa de recambio 5-HIAA/5-HT no presentó diferencias sexuales ni en mesencéfalo ni en hipotálamo, por ir en el mismo sentido las variaciones encontradas en las concentraciones de ambos compuestos. Este resultado apoyaría la impresión de que las diferencias sexuales son un fenómeno general en animales tratados y controles. Además en ninguna de estas regiones fue significativa la interacción tratamiento x sexo.

#### IV.2.4 EFECTOS EN LA EDAD ADULTA

Los animales estudiados en la edad adulta fueron sólo machos (ver sección III.3.3 *Grupos experimentales*). Las comparaciones entre las medias de los animales tratados y controles se hizo por medio de la prueba de *t* de Student. No se encontraron diferencias significativas en el sistema dopaminérgico para los parámetros estudiados en el cuerpo

estriado (Tabla 18). Sin embargo, las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en el cuerpo estriado sufrieron descenso en los animales tratados (del 17% ( $p<0,05$ ) para la 5-HT y del 11% ( $p<0,01$ ) para el 5-HIAA) [Tabla 19, Fig. 21]. Al descender en similar medida los niveles tanto del neurotransmisor como del metabolito, la tasa de recambio 5-HIAA/5-HT no se vió modificada significativamente. En el hipotálamo, se observó también una menor concentración de 5-HT en los animales tratados (un 11% menor,  $p<0,05$ ) (Tabla 19, Fig. 22), sin que variaran de forma significativa los niveles de 5-HIAA. Estos resultados se reflejaron en el índice 5-HIAA/5-HT, que presentó un aumento del 8% en los animales tratados ( $p<0,05$ ). No aparecieron variaciones significativas en las variables estudiadas en el mesencéfalo.

#### IV.2.5 PERFIL DE DESARROLLO DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS

Los datos de cada variable se analizaron dentro de un grupo experimental comparando los valores obtenidos a las distintas edades (7, 14, 22 días y edad adulta). Para estas comparaciones se emplearon el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de la prueba *U* de Mann-Whitney. Todos los parámetros estudiados variaron significativamente con la edad en las tres áreas encefálicas estudiadas para todos los grupos experimentales ( $p<0,0001$  en todos los casos). Las comparaciones entre las edades en cada grupo se refieren a los datos mostrados en las Tablas 8-19, y se ilustran con una selección-resumen en la Fig. 23. A continuación comentaremos los resultados correspondientes a los machos controles y tratados con naltrexona, por ser en estos dos grupos experimentales

donde se siguió el desarrollo hasta la edad adulta.

- Estriado

La concentración de DA en los animales controles se incrementa a cada edad de forma significativa hasta la edad adulta. La principal diferencia en este perfil general en los animales tratados está relacionada con el día 14. Para la subpoblación *A* (14 días de edad), la diferencia entre sus valores y los de los 7 días no fue significativa. La subpoblación *B* sí mostró niveles significativamente mayores que los encontrados a 7 días. Sin embargo, en esta subpoblación los valores no difirieron de forma significativa de los observados en los animales tratados de 22 días.

También aumentó la concentración de DOPAC desde los 7 a los 14 días en los animales controles, aunque los incrementos no fueron significativos entre los días 7 y 14 ni entre los 22 días y la edad adulta, produciéndose el aumento más importante entre los 14 y los 22 días de edad. En los animales tratados el incremento se produce de forma más gradual. En la subpoblación *A* (día 14) los niveles de DOPAC son significativamente mayores que al día 7. Igual sucede para la subpoblación *B*, que, además, y a diferencia de la anterior, presenta valores significativamente menores que al día 22. Los valores de los adultos fueron superiores a los de ambas subpoblaciones.

Aunque la concentración de HVA encontrada en los adultos controles sea mayor



que a los 7 días, el pico se produce a los 14 días. Los valores descienden al día 22, volviendo a subir en la edad adulta. En los animales tratados este aumento entre el día 22 y la edad adulta no alcanza significación estadística. Además, en la subpoblación *A* (pero no en la *B*) (14 días), la concentración de HVA es significativamente menor que en la edad adulta.

La tasa de recambio DOPAC/DA desciende en los animales controles hasta la edad adulta, aunque experimenta una pequeña subida -sin significación estadística- entre los días 14 y 22. Las variaciones en este perfil en los animales tratados se producen con respecto al día 14. La supoblación *A* no difiere significativamente de los valores al día 7. En la supoblación *B* sí se produce un descenso en índice DOPAC/DA frente a los 7 días. Esta bajada es proporcionalmente mayor que en los controles, por lo que el valor de la supoblación *B* sí es significativamente menor la tasa encontrada a los 22 días (a diferencia de los controles en que no lo era).

El valor pico del índice HVA/DA en los animales controles se produce al día 14 descendiendo al día 22. Entre los 22 días y la edad adulta no se produce una bajada significativa. Tampoco es significativa la diferencia entre el valor del adulto y el obtenido a los 7 días. En los animales tratados el pico también se produce a los 14 días. En cambio, sí fue significativo en este grupo experimental el descenso en la tasa HVA/DA entre los 22 días y el valor de los adultos. Además, en la supoblación *A* (pero no en la *B*) su valor no difirió significativamente del obtenido para los animales tratados en el día 22.

La concentración de 5-HT en el estriado se incrementa a todas las edades estudiadas hasta la edad adulta en los animales controles. En los individuos tratados con naltrexona no se produce una variación significativa entre el valor al día 22 y en los adultos. En la subpoblación *A* (no en la *B*) la concentración de 5-HT no difirió significativamente de la observada para los animales tratados en el día 7.

También los valores de 5-HIAA aumentan con la desde el día 7 a la edad adulta, aunque la concentración a esta última edad desciende frente la encontrada a los 22 días. Este descenso también se produce en los animales tratados de forma más acusada, como reflejo del efecto del tratamiento al día 22. Sin embargo, los valores de la subpoblación *A* (14 días) no difirieron de los obtenidos a los 7 días (sí lo hicieron en la subpoblación *B*).

El índice 5-HIAA/5-HT alcanzó su vañor máximo a los 14 días en los animales controles. Experimentó un descenso el día 22 a valores próximos a los del día 7, presentando una tasa inferior en la edad adulta. La subpoblación *A* (día 14) no mostró el valor pico del desarrollo, observándose un índice menor que al día 22. La subpoblación *B* sí presentó un valor máximo.

- Mesencéfalo

Los valores de la concentración de 5-HT en el grupo control aumentan a cada edad

desde el día 7 al 22. La subida entre los 22 días y la edad adulta no fue significativa. En los animales tratados tampoco alcanzó significación la diferencia entre los niveles de los 22 días y del adulto. No se produjo en la subpoblación *A* (pero sí en la *B*) (14 días) aumento significativo en la concentración de 5-HT frente a los niveles encontrados para el día 7.

La concentración de 5-HIAA en los animales controles se incrementa entre el día 7 y la edad adulta, aunque el valor máximo se alcanza al día 22. Se produce después un descenso en los animales adultos que quedan con valores menores a los encontrados al día 14 y ligeramente más altos que los de los 7 días. En los animales tratados con naltrexona, la concentración de 5-HT en el adulto no difiere significativamente de los niveles encontrados al día 7. La subpoblación *A* (14 días) tampoco presenta diferencias significativas con el valor observado a los 7 días, ni con los niveles encontrados para los adultos. En la subpoblación *B* estas diferencias sí alcanzaron significación.

La tasa de recambio 5-HIAA/5-HT alcanza el máximo observado a día 14 en los animales controles. Al día 22 desciende a valores similares al día 7 y sigue decreciendo hasta la edad adulta. En los animales tratados no se produjo tal pico entre los días 7 y 22 que presentan valores que no son estadísticamente distintos entre sí. Mientras que la subpoblación *A* (día 14) muestra valores significativamente menores que a los días 7 y 22, la subpoblación *B* no presentó un índice 5-HIAA/5-HT significativamente distinto a los encontrados a esas edades. En los animales tratados también fue menor la tasa del adulto

a la observada a los 7 días.

- Hipotálamo

Los valores de la concentración de 5-HT en el grupo control aumentan significativamente a cada edad estudiada desde el día 7 a la edad adulta. En los animales tratados con naltrexona no hubo un aumento significativo entre los niveles al día 22 y en el adulto. Además, la concentración de 5-HT encontrada para la subpoblación A (14 días) no fue estadísticamente distinta de la de los animales tratados al día 7 (sí lo fue en la subpoblación B).

Aunque la concentración de 5-HIAA en los animales controles es mayor en la edad adulta que a los 7 días, el máximo apareció al día 22. Posteriormente los niveles de 5-HIAA experimentaron un descenso hacia la edad adulta, quedando por debajo del valor obtenido a los 14 días. El perfil en los animales tratados difirió de los controles respecto al día 14: los animales de la subpoblación A no presentaron una concentración de 5-HIAA significativamente mayor que la encontrada al día 7 y los valores de los animales de la subpoblación B no llegaron a ser significativamente mayores que los encontrados para los adultos.

En los animales controles, el índice 5-HIAA/5-HT no varió significativamente entre los días 7 y 14, y descendió a los 22 días y la edad adulta por debajo de los niveles del día

7. En los animales tratados con naltrexona no hubo variaciones significativas entre los días 7, 14 (subpoblaciones A y B) y 22. Sin embargo, sí se produjo un descenso significativo de la tasa de recambio 5-HIAA/5-HT en la edad adulta frente a las edades mencionadas.

\* Diferencias sexuales

Los perfiles de desarrollo encontrados para las hembras fueron similares a los de sus correspondientes grupos de machos, con algunas excepciones que señalar. Así, en las hembras controles -a diferencia de los machos- sí fueron significativas las diferencias entre los días 14 y 22 para la tasa de recambio DOPAC/DA en el cuerpo estriado y no lo fueron para la concentración de 5-HIAA en mesencéfalo. En cuanto a las hembras tratadas, presentaron diferencias significativas entre los 7 y los 14 días de edad (subpoblación A) para la DA y para el índice DOPAC/DA, y entre 14 y 22 para la tasa HVA/DA (siempre en estriado), mientras en los machos tratados (subpoblación A), como se recordará, no fue así. También a diferencia de los machos, las hembras tratadas mostraron valores significativamente distintos entre los días 7 y 14 (subpoblación A) para las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en mesencéfalo, mientras que en concordancia con esto, los valores de 5-HIAA/5-HT entre estas edades no difirieron estadísticamente.

En resumen, puede afirmarse que, en los animales controles, la concentración de los neurotransmisores (DA y 5-HT) aumenta de forma continuada con la edad hasta alcanzar los niveles del adulto (con la salvedad de que entre 22 días y el adulto no fue

significativa la elevación en la 5-HT mesencefálica). Así, en este aspecto no es posible concluir una diferencia clara entre los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico. Los niveles de 5-HIAA descienden desde el día 22 a la edad adulta en las tres regiones estudiadas. Sin embargo, esto no ocurre con los metabolitos de la DA: el DOPAC no varía apreciablemente entre esas edades y el HVA aumenta su concentración del día 22 a la edad adulta. Los índices de recambio (a excepción del DOPAC/DA) descienden desde el día 14 llegando en el adulto a valores próximos o inferiores a los del día 7. Por su parte la tasa de recambio DOPAC/DA disminuye desde los 7 días hacia la edad adulta.

Los efectos del tratamiento con naltrexona sobre el perfil de desarrollo encontrados para el sistema dopaminérgico están en relación con las variaciones producidas durante las dos primeras semanas de vida. El tratamiento tiene efecto sobretodo en la subpoblación *A* de esta edad, y se manifiesta en todos los parámetros estudiados. En la subpoblación *B* sólo en las concentraciones DA y el DOPAC se observaron dichas variaciones en el perfil desarrollo. En el sistema serotoninérgico también aparecen diferencias en el desarrollo de los parámetros a edades más avanzadas, afectando a la evolución de las concentraciones de 5-HT y de 5-HIAA entre los 22 días y la edad adulta en las tres áreas encefálicas estudiadas y de la tasa 5-HIAA/5-HT en el mesencéfalo y cuerpo estriado. Además, en torno al día 14, las variaciones en la subpoblación *A* afectaron al patrón de desarrollo de los tres parámetros en estriado y mesencéfalo y a la concentración de 5-HT en el hipotálamo y en la subpoblación *B* a la concentración 5-HIAA en el hipotálamo y al índice de recambio 5-HIAA/5-HT en el mesencéfalo.

En general estas modificaciones son, por tanto, el correlato del efecto del tratamiento con naltrexona encontrado a cada edad y no parecen descubrir diferencias adicionales sobre el patrón de desarrollo de los parámetros en lo concerniente a como se producen los cambios de una edad a otra.

Las diferencias sexuales encontradas entre los controles en cuanto al perfil de desarrollo son pocas y no parecen tener una especial significación. Por lo que se refiere a las hembras tratadas, las diferencias con los machos tratados con naltrexona sugieren un menor efecto del tratamiento en las hembras en todos los casos en que aparecen, a excepción de la observada para la tasa DOPAC/DA entre los 7 y 14 días (el efecto sería mayor).

#### IV.2.6 TABLAS Y GRÁFICAS



**TABLA 8**

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE  
NALTREXONA DESDE EL NACIMIENTO A LOS 7 DÍAS DE  
EDAD SOBRE LOS CONTENIDOS DE DA, DOPAC, HVA Y  
LOS ÍNDICES DOPAC/DA Y HVA/DA ENCEFÁLICOS  
(MEDIA  $\pm$  EEM)

		Estriado	
		♂	♀
DA	CONTR	1717 $\pm$ 128	1594 $\pm$ 131
	NALTX	1697 $\pm$ 134	1757 $\pm$ 121
DOPAC	CONTR	263 $\pm$ 20	250 $\pm$ 19
	NALTX	282 $\pm$ 24	273 $\pm$ 23
HVA	CONTR	104 $\pm$ 11	100 $\pm$ 10
	NALTX	127 $\pm$ 10	124 $\pm$ 8
DOPAC/DA	CONTR	,15 $\pm$ ,00	,16 $\pm$ ,01
	NALTX	,17 $\pm$ ,01	,16 $\pm$ ,01
HVA/DA	CONTR	,06 $\pm$ ,00	,06 $\pm$ ,00
	NALTX	,08 $\pm$ ,00*	,07 $\pm$ ,00

Los valores representan la media de 9-12 medidas. Las concentrations están expresadas como ng/g de tejido. \*p < 0,05 frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan).

## Efectos del tratamiento con NALTX

### Día 7

Tasa de recambio HVA/DA estriatal

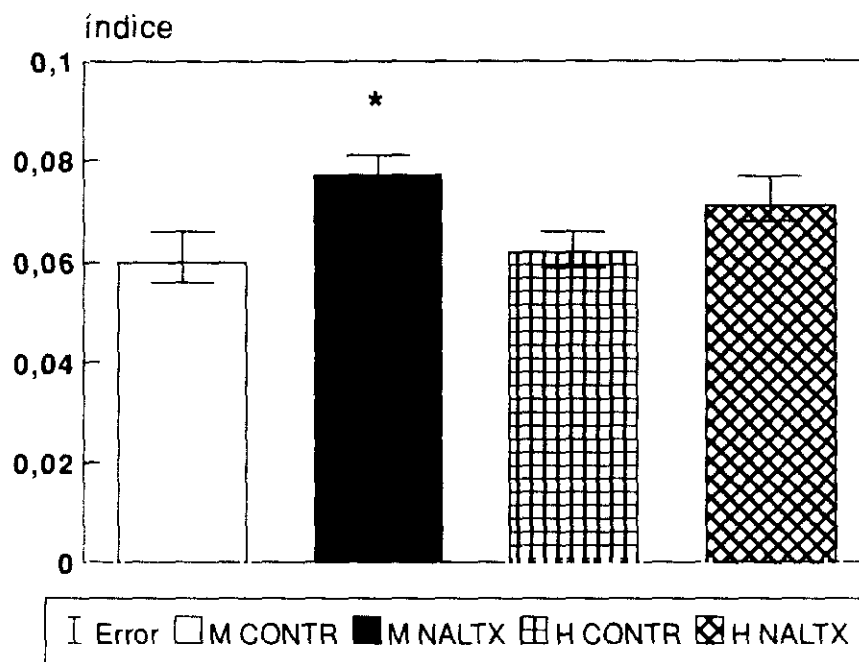


FIG. 16. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 9-12 medidas.  
\* $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan)

**TABLA 9**

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE NALTREXONA DESDE EL NACIMIENTO A LOS 7 DÍAS DE EDAD SOBRE LOS CONTENIDOS DE 5-HT, 5-HIAA Y EL ÍNDICE 5-HIAA/5-HT ENCEFÁLICOS (MEDIA±EEM)

		Estriado		Mesencéfalo		Hipotálamo	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
5-HT	CONTR	144±12	122±1	401±20	388±24	115±10	120±9
	NALT	166±20	135±4	417±18	351±18	128±10	130±11
5-HIAA	CONTR	63±12	49±5	300±36	270±30	63±10	63±8
	NALT	78±13	59±3	289±18	211±17	64±7	62±9
5-HIAA/5HT	CONTR	,43±,06	,40±,04	,73±,05	,69±,04	,53±,04	,51±,02
	NALT	,46±,03	,44±,03	,69±,02	,59±,02	,49±,02	,46±,03

Los valores representan la media de 9-12 medidas, excepto en el estriado (N=4-5). Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido.

**TABLA 10**

DIFERENCIAS EN LOS CONTENIDOS DE DA, DOPAC, HVA Y  
LOS ÍNDICES DOPAC/DA Y HVA/DA ENCEFÁLICOS ENTRE  
LA SUBPOBLACIÓN A Y LA SUBPOBLACIÓN B  
(MEDIA $\pm$ EEM)

	Estriado	
	Sub.A	Sub.B
DA	2168 $\pm$ 112	3360 $\pm$ 127§
DOPAC	419 $\pm$ 24	339 $\pm$ 23*
HVA	251 $\pm$ 15	576 $\pm$ 20§
DOPAC/DA	,19 $\pm$ ,01	,10 $\pm$ ,01§
HVA/DA	,12 $\pm$ ,01	,17 $\pm$ ,01§

Los valores representan la media de 16 medidas para la subpoblación A y 8 para la subpoblación B ( $\sigma + \varphi$ ). Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido. \*p<0,05; §p<0,0001 frente a la subpoblación A (prueba t de Student).

**TABLA 11**

DIFERENCIAS EN LOS CONTENIDOS DE 5-HT, 5-HIAA Y EL ÍNDICE 5-HIAA/5-HT ENCEFÁLICOS ENTRE LA SUBPOBLACIÓN A Y LA SUBPOBLACIÓN B (MEDIA±EEM)

	Estriado		Mesencéfalo		Hipotálamo	
	Sub.A	Sub.B	Sub.A	Sub.B	Sub.A	Sub.B
5-HT	166±10	297±18§	514±27	988±19§	169±13	716±16§
5-HIAA	67±6	190±10§	300±17	694±13§	81±8	339±7§
5-HIAA/5HT	,40±,02	,65±,02§	,58±,02	,70±,01§	,47±,03	,47±,01

Los valores representan la media de 16 medidas para la subpoblación A y 8 para la subpoblación B ( $\sigma + \varphi$ ). Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido. § $p < 0,0001$  frente a la subpoblación A (prueba t de Student).<sup>4</sup>

**TABLA 12**

EFFECTOS ADMINISTRACIÓN DIARIA DE NALTREXONA  
DESDE EL NACIMIENTO A LOS 14 DÍAS DE EDAD SOBRE  
LOS CONTENIDOS DE DA, DOPAC, HVA Y LOS ÍNDICES  
DOPAC/DA Y HVA/DA ENCEFÁLICOS EN LA  
SUBPOBLACIÓN A (MEDIA  $\pm$  EEM)

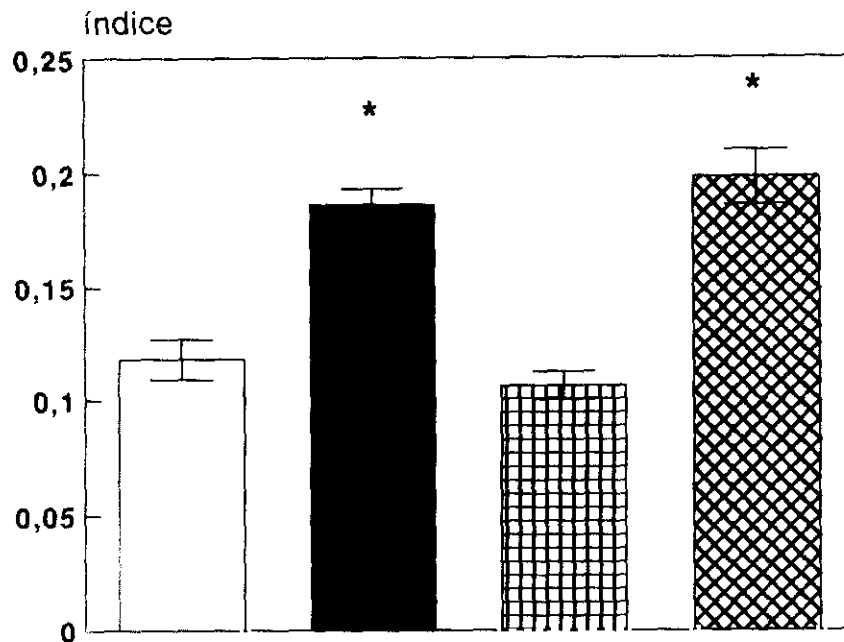
		Estriado	
		♂	♀
DA	CONTR	2719 $\pm$ 192	2917 $\pm$ 130
	NALTX	2151 $\pm$ 251	2175 $\pm$ 128*
DOPAC	CONTR	321 $\pm$ 32	312 $\pm$ 28
	NALTX	398 $\pm$ 40	427 $\pm$ 31*
HVA	CONTR	548 $\pm$ 30	486 $\pm$ 29
	NALTX	231 $\pm$ 27*	259 $\pm$ 19*
DOPAC/DA	CONTR	,12 $\pm$ ,01	,11 $\pm$ ,01
	NALTX	,19 $\pm$ ,01*	,20 $\pm$ ,01*
HVA/DA	CONTR	,21 $\pm$ ,01	,17 $\pm$ ,01
	NALTX	,11 $\pm$ ,01*	,12 $\pm$ ,01*

Los valores representan la media de 10-12 medidas para los controles y 4-5♂/12♀ para la subpoblación A. Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido. \*p < 0,05 frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan).

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Día 14 (subpoblación A)

### Tasa de recambio DOPAC/DA estriatal



### Tasa de recambio HVA/DA estriatal

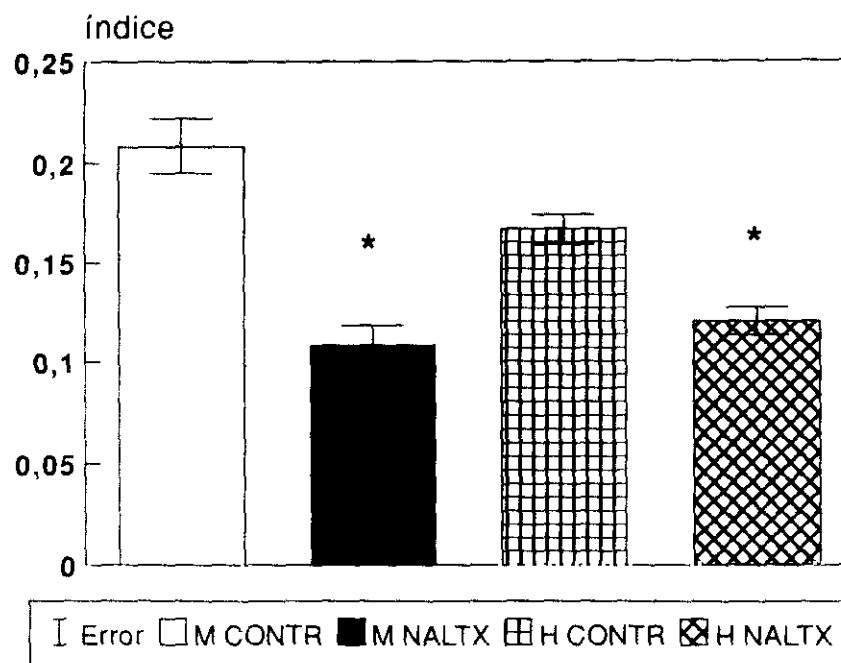


FIG. 17. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 10-12 medidas para los controles y 4-5 (machos)/12 (hembras) para la subpoblación A. \* $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan)

**TABLA 13**

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE NALTREXONA DESDE EL NACIMIENTO A LOS 14 DÍAS DE EDAD SOBRE LOS CONTENIDOS DE 5-HT, 5-HIAA Y EL ÍNDICE 5-HIAA/5-HT ENCEFÁLICOS EN LA SUBPOBLACIÓN A (MEDIA±EEM)

		Estriado		Mesencéfalo		Hipotálamo	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
5-HT	CONTR	328±12	317±7	942±22	955±32	719±23	696±35
	NALTX	144±6*	173±12*	492±50*	523±33*	175±50*	167±17*
5-HIAA	CONTR	207±7	206±5	740±26	757±42	369±12	366±15
	NALTX	56±7*	71±8*	294±36*	303±22*	88±15*	78±10*
5-HIAA/5HT	CONTR	,63±,02	,65±,01	,79±,02	,79±,02	,52±,01	,53±,03
	NALTX	,39±,03*	,40±,01*	,59±,03*	,58±,02*	,49±,03	,46±,02*

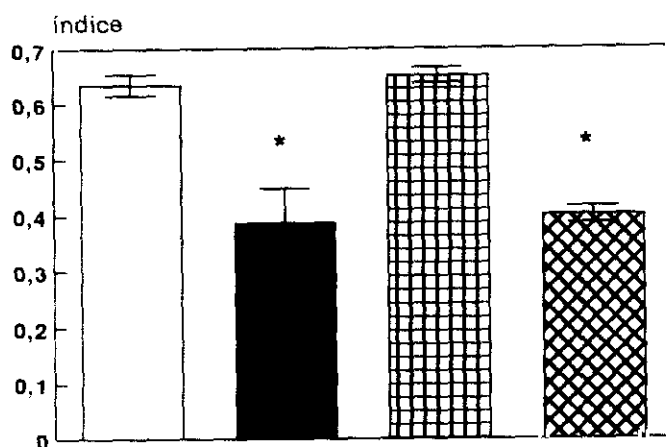
Los valores representan la media de 10-12 medidas para los controles y 4-5♂/12♀ para la subpoblación A. Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido. \*p<0,05 frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan).



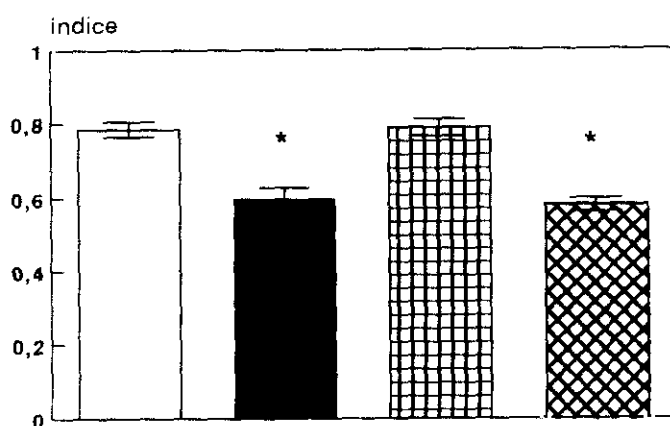
# Efectos del tratamiento con NALTX

## Día 14 (subpoblación A)

Tasa de recambio 5-HIAA/5-HT estriatal



Tasa de recambio 5-HIAA/5-HT mesencefálica



Tasa de recambio 5-HIAA/5-HT hipotalámica

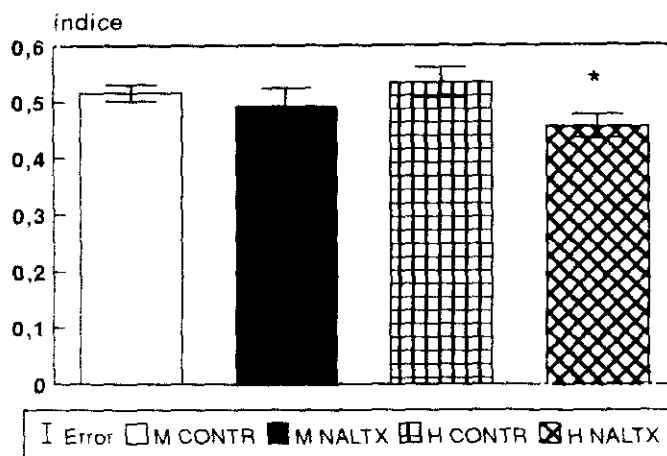


FIG. 18. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 10-12 medidas para los controles y 4-5 (machos)/12 (hembras) para la subpoblación A. \* $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan)

**TABLA 14**

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE  
NALTREXONA DESDE EL NACIMIENTO A LOS 14  
DÍAS DE EDAD SOBRE LOS CONTENIDOS DE DA,  
DOPAC, HVA Y LOS ÍNDICES DOPAC/DA Y HVA/DA  
ENCEFÁLICOS EN LA SUBPOBLACIÓN B  
(MEDIA  $\pm$  EEM)

		Estriado
DA	CONTR	2809 $\pm$ 120
	NALTX	3360 $\pm$ 127¶
DOPAC	CONTR	316 $\pm$ 21
	NALTX	340 $\pm$ 23
HVA	CONTR	520 $\pm$ 21
	NALTX	576 $\pm$ 21
DOPAC/DA	CONTR	,11 $\pm$ ,01
	NALTX	,10 $\pm$ ,01
HVA/DA	CONTR	,19 $\pm$ ,01
	NALTX	,17 $\pm$ ,01

Los valores representan la media de 22 (controles) u 8  
(subpoblación B) ( $\sigma + \varphi$ ) medidas. Las concentraciones están  
expresadas como ng/g de tejido. ¶p < 0,01 frente al  
correspondiente grupo control (prueba de t de Student).

**TABLA 15**

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE NALTREXONA DESDE EL NACIMIENTO A LOS 14 DÍAS DE EDAD SOBRE LOS CONTENIDOS DE 5-HT, 5-HIAA Y EL ÍNDICE 5-HIAA/5-HT ENCEFÁLICOS EN LA SUBPOBLACIÓN B (MEDIA±EEM)

		Estriado	Mesencéfalo	Hipotálamo
5-HT	CONTR	323±7	948±19	709±20
	NALTX	297±18	988±19	716±16
5-HIAA	CONTR	206±4	747±23	368±9
	NALTX	190±10	694±13*	339±7*
5-HIAA/5-HT	CONTR	,64±,01	,79±,01	,52±,01
	NALTX	,65±,02	,69±,01§	,47±,01*

Los valores representan la media de 22 (controles) u 8 (subpoblación B) (♂+♀) medidas. Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido. \*p<0,05; §p<0,0001 frente al correspondiente grupo control (prueba t de Student).

**TABLA 16**

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE  
NALTREXONA DESDE EL NACIMIENTO A LOS 22 DÍAS DE  
EDAD SOBRE LOS CONTENIDOS DE DA, DOPAC, HVA Y  
LOS ÍNDICES DOPAC/DA Y HVA/DA ENCEFÁLICOS  
(MEDIA  $\pm$  EEM)

		Estriado	
		♂	♀
DA	CONTR	3712 $\pm$ 239	3756 $\pm$ 242
	NALTX	3733 $\pm$ 207	3904 $\pm$ 309
DOPAC	CONTR	501 $\pm$ 36	484 $\pm$ 30
	NALTX	481 $\pm$ 32	490 $\pm$ 37
HVA	CONTR	323 $\pm$ 36	241 $\pm$ 17
	NALTX	337 $\pm$ 27	282 $\pm$ 31
DOPAC/DA	CONTR	,14 $\pm$ ,01	,13 $\pm$ ,00
	NALTX	,13 $\pm$ ,00	,13 $\pm$ ,00
HVA/DA	CONTR	,09 $\pm$ ,01	,07 $\pm$ ,00
	NALTX	,09 $\pm$ ,01	,07 $\pm$ ,01

Los valores representan la media de 9-11 medidas. Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido.

**TABLA 17**

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE NALTREXONA DESDE EN NACIMIENTO A LOS 22 DÍAS DE EDAD SOBRE LOS CONTENIDOS DE 5-HT, 5-HIAA y EL ÍNDICE 5-HIAA/5-HT ENCEFÁLICOS (MEDIA±EEM)

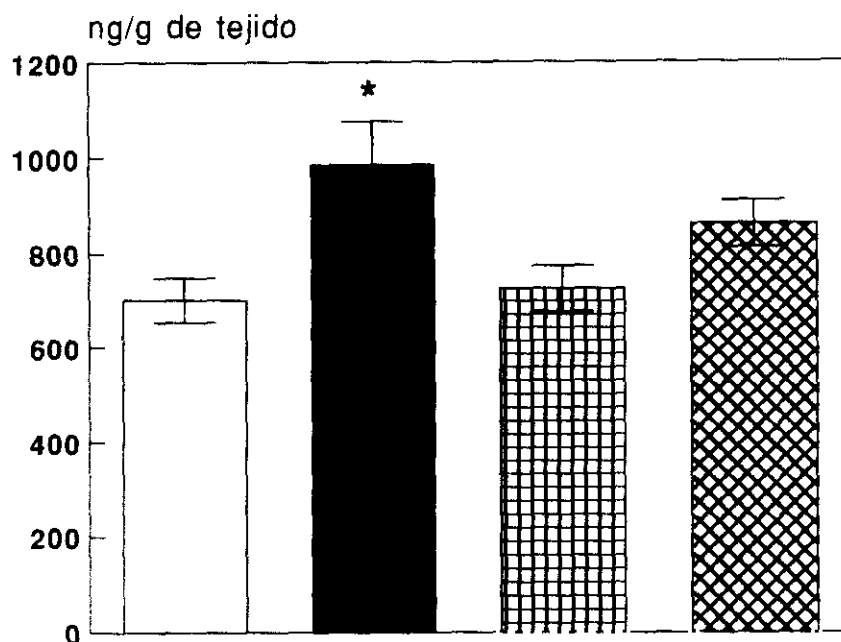
		Estriado		Meséncéfalo		Hipotálamo	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
5-HT	CONTR	701±47	724±48	1254±25	1158±40	1442±40	1290±45
	NALTX	984±91*	861±49	1333±37	1191±44	1468±61	1332±44
5-HIAA	CONTR	375±15	360±16	855±17	770±25	592±52	526±25
	NALTX	477±27*	428±20*	1016±27*	836±42	720±17*	650±32*
5-HIAA/5HT	CONTR	,55±,03	,51±,02	,68±,02	,67±,02	,41±,01	,41±,02
	NALTX	,50±,03	,50±,02	,77±,03*	,70±,02	,49±,01*	,48±,02*

Los valores representan la media de 9-11 medidas. Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido. \*p<0,05 frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan).

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Día 22

### Concentración de 5-HT estriatal



### Concentración de 5-HIAA estriatal

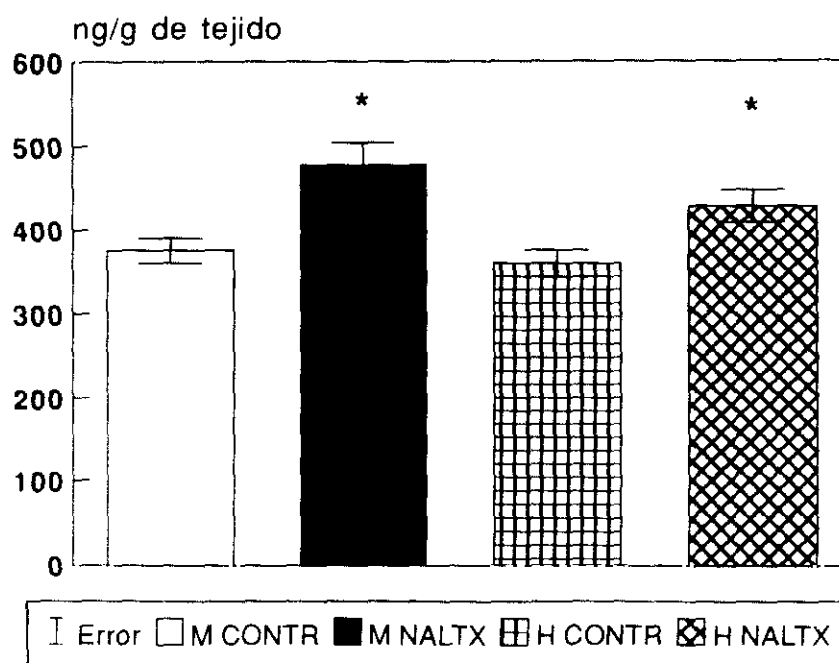
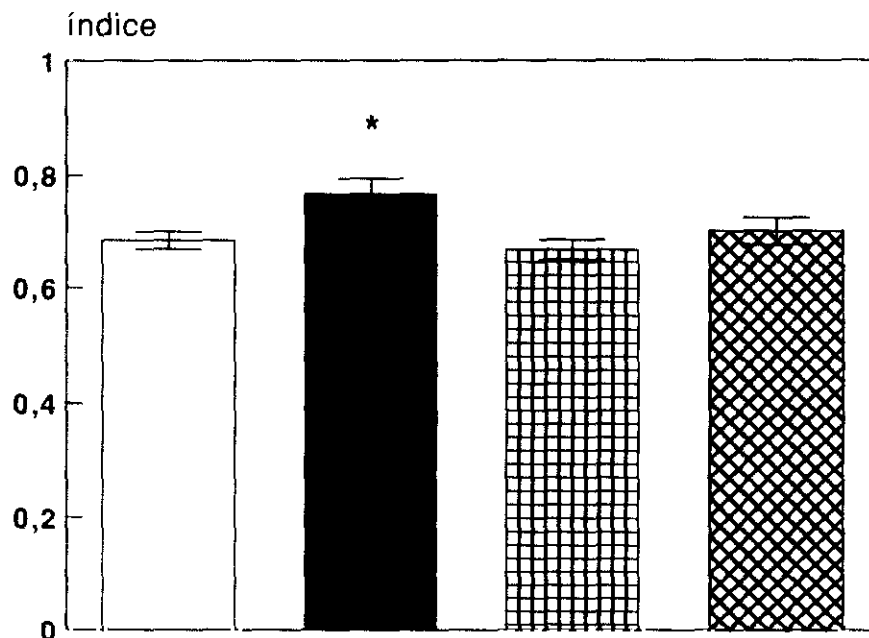


FIG. 19. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 9-11 medidas.  
\*p<0,05 frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan)

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Día 22

### Tasa de recambio 5-HIAA/HT mesencefálica



### Tasa de recambio 5-HIAA/5-HT hipotalámica

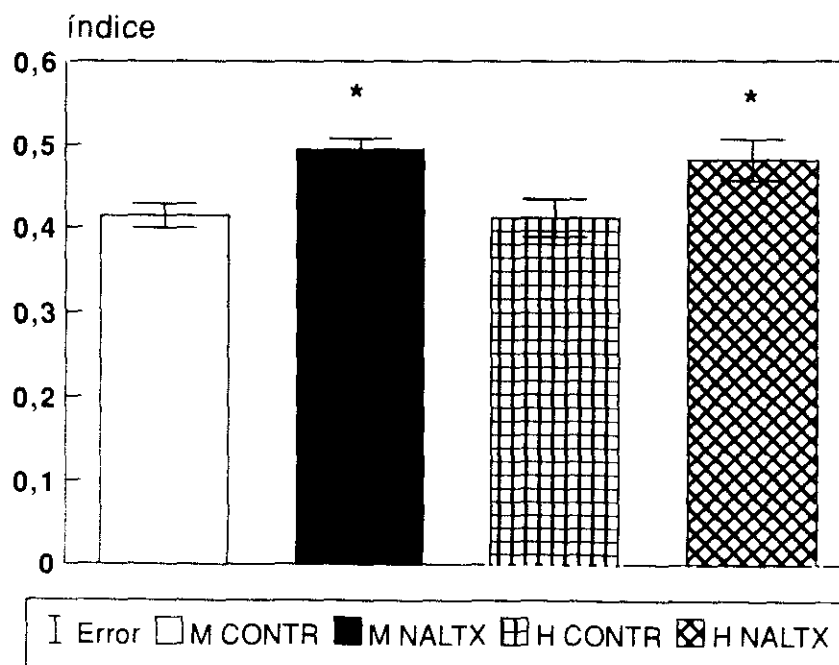


FIG. 20. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 9-11 medidas.  
\* $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan)

**TABLA 18**

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE  
NALTREXONA DESDE EL NACIMIENTO HASTA EL  
DESTETE SOBRE LOS CONTENIDOS DE DA, DOPAC,  
HVA Y LOS ÍNDICES DOPAC/DA Y HVA/DA  
ENCEFÁLICOS EN LA EDAD ADULTA (MEDIA $\pm$ EEM)

		Estriado
DA	CONTR	5683 $\pm$ 104
	NALTX	5835 $\pm$ 107
DOPAC	CONTR	498 $\pm$ 27
	NALTX	499 $\pm$ 22
HVA	CONTR	418 $\pm$ 29
	NALTX	418 $\pm$ 27
DOPAC/DA	CONTR	,09 $\pm$ ,00
	NALTX	,08 $\pm$ ,01
HVA/DA	CONTR	,07 $\pm$ ,00
	NALTX	,07 $\pm$ ,00

Los valores representan la media de 15-16 medidas. Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido.



**TABLA 19**

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE NALTREXONA DESDE EL NACIMIENTO HASTA EL DESTETE SOBRE LOS CONTENIDOS DE 5-HT, 5-HIAA Y EL ÍNDICE 5-HIAA/5-HT ENCEFÁLICOS EN LA EDAD ADULTA (MEDIA  $\pm$  EEM)

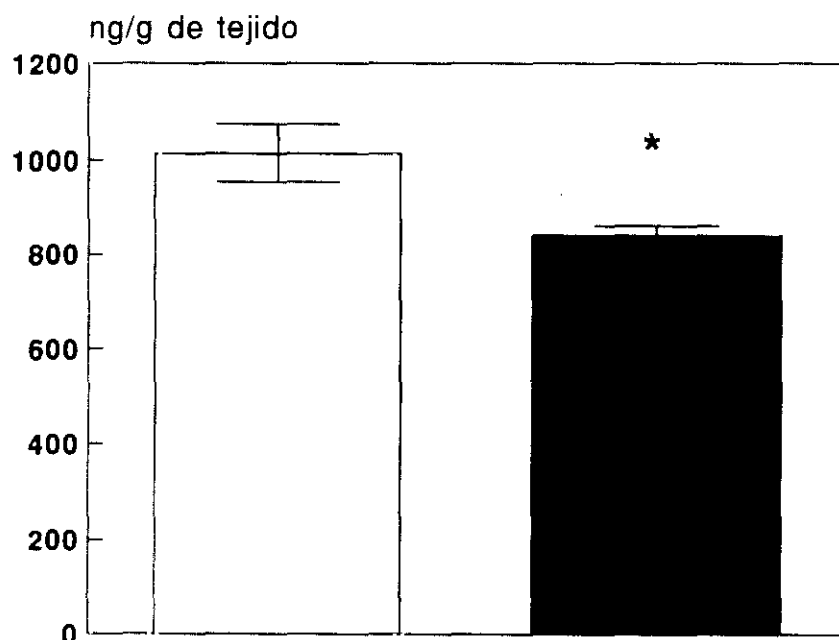
		Estriado	Mesencéfalo	Hipotálamo
5-HT	CONTR	1014 $\pm$ 60	1437 $\pm$ 95	1707 $\pm$ 47
	NALTX	840 $\pm$ 21*	1305 $\pm$ 59	1523 $\pm$ 62*
5-HIAA	CONTR	271 $\pm$ 9	365 $\pm$ 8	335 $\pm$ 7
	NALTX	240 $\pm$ 5¶	336 $\pm$ 14	322 $\pm$ 9
5-HIAA/5-HT	CONTR	,27 $\pm$ ,01	,27 $\pm$ ,01	,20 $\pm$ ,00
	NALTX	,29 $\pm$ ,01	,26 $\pm$ ,00	,21 $\pm$ ,00*

Los valores representan la media de 12-17 medidas. Las concentraciones están expresadas como ng/g de tejido. \*p < 0,05; ¶p < 0,01 frente al correspondiente grupo control (prueba *t* de Student).

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Edad adulta

### Concentración de 5-HT estriatal



### Concentración de 5-HIAA estriatal

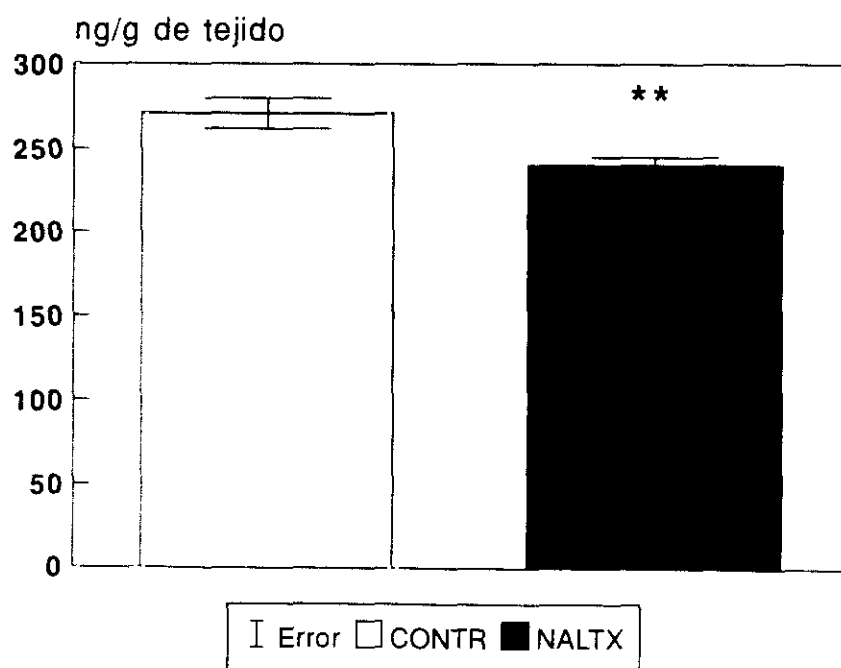


FIG. 21. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 12-17 medidas.  
\* $p < 0,05$  frente al grupo control (prueba t de Student)

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Edad adulta

### Tasa de recambio 5-HIAA/5-HT hipotalámica

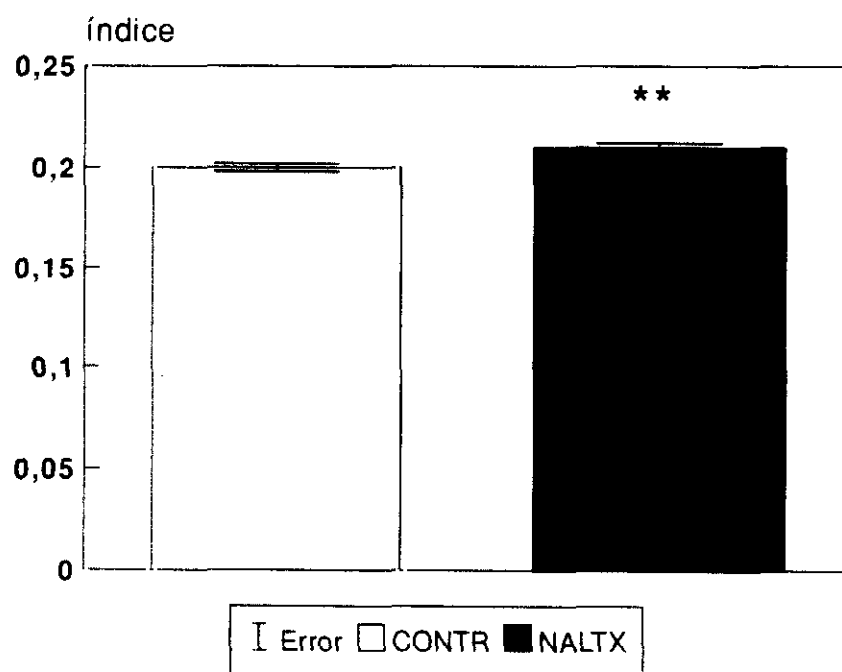
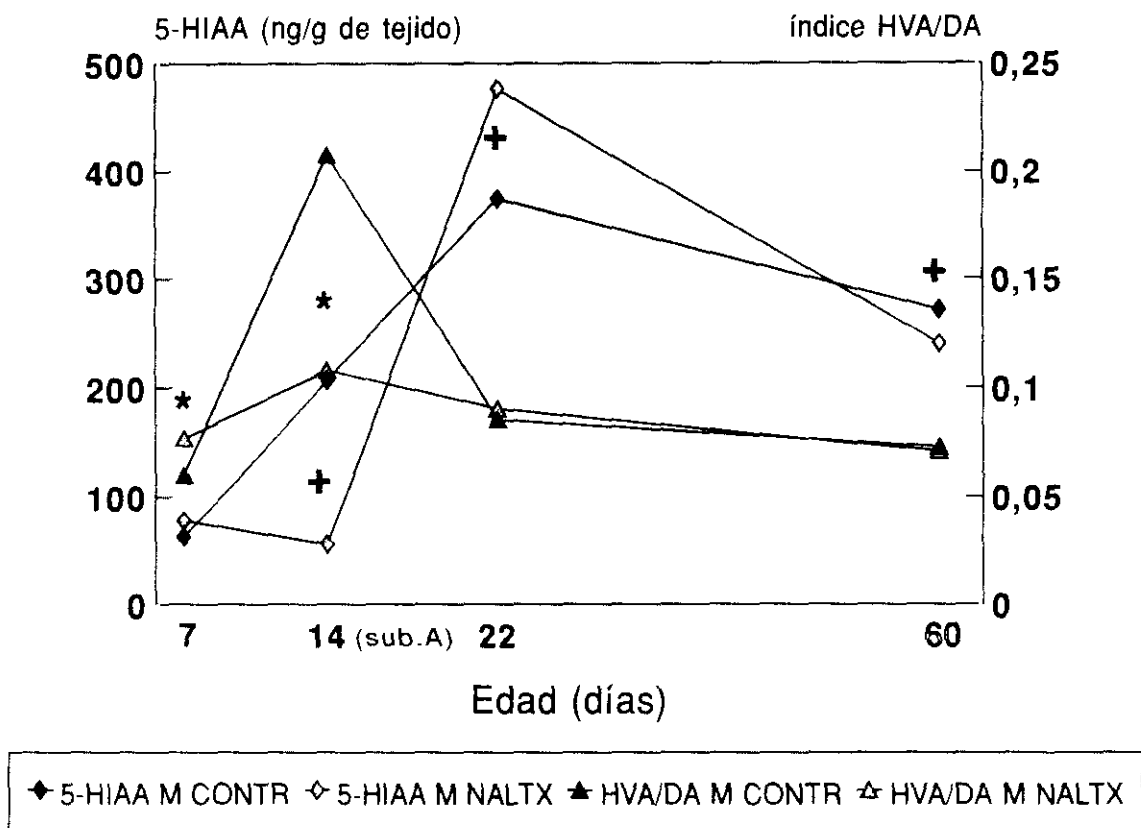


FIG. 22. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 12-17 medidas.  
\* $p < 0,05$  frente al grupo control (prueba t de Student)

## Comparación del efecto de la NALTX en los dos sistemas: Selección representativa

**Desarrollo del contenido de 5-HIAA y la tasa HVA/DA estriatales**



**FIG. 23.** Cada punto representa la media de 4-17 observaciones.  
\* $p < 0,05$  (HVA/DA); + $P < 0,05$  (5-HIAA) frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan)

#### IV.2.7 DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en nuestro trabajo para los animales controles están, en términos generales, básicamente en concordancia con lo descrito anteriormente por otros autores (Bardo y col. 1982; Keller y col. 1973; Kmiecik-Kolada y Kowalski 1986; Noisin y Thomas 1988; Nomura y col. 1976; Parés-Herbuté y col. 1989; Porcher y Heller 1972; Rodríguez de Fonseca y col. 1991, 1992; Roth y col. 1980; Sharma y col. 1988; Siddiqui y col. 1989; Watts y Stanley 1984; Wilson y col. 1986) y lo encontrado en nuestro laboratorio (González y Leret 1992; López 1991, Tesis Doctoral). De todas formas debe aclararse que la comparación con los datos de otros autores no siempre resulta fácil y a menudo aparecen ciertas discrepancias (sobre todo cuantitativas) en la literatura. Las razones de estas variaciones pueden deberse a diversos factores: diferencias en la cepa elegida, en la disección de las regiones, la forma en la que se expresan los resultados (unidades de masa o moles, concentración respecto a una unidad de peso fresco de tejido o frente a la concentración de proteínas, representaciones semilogarítmicas), y procedimiento utilizado para la medición de las aminos (fluorescencia, métodos radioenzimáticos, HPLC). Además, más concretamente, en lo que se refiere a estudios ontogenéticos, la dificultad aumenta al no elegir siempre los autores las mismas edades del desarrollo para sus trabajos. Tampoco coinciden totalmente las regiones objeto de estudio, bien por no ser investigada la misma área o por incluir diversas estructuras conjuntamente. Por otro lado, algunos autores utilizan un sólo sexo o bien mezclan machos y hembras. De hecho, una característica destacable de nuestro trabajo es precisamente el estudio

comparado de ambos sexos, que apenas aparece en la literatura. Otra diferencia frecuente con nuestro estudio es el ciclo de luz empleado: en nuestro trabajo ha sido realizado durante la fase oscura del ciclo (de mayor actividad en la rata), en paralelo con las pruebas comportamentales que luego discutiremos, mientras que los de la mayoría de los autores tienen lugar durante la fase lumínica. Finalmente, los parámetros elegidos no son siempre los mismos, puesto que hay trabajos en los que no se miden los metabolitos de degradación o no se calcula la tasa de recambio, mientras que otros autores sólo suministran este último dato.

Estas diferencias hacen que nuestro estudio tenga mayor interés en cuanto que proporciona información adicional sobre el complejo panorama del desarrollo de los sistemas monoaminérgicos, aunque, por otra parte sólo nos permitan hacer comparaciones de tipo muy general con los trabajos previos. Podemos afirmar, sin embargo, que nuestros datos confirman observaciones anteriores según las cuales se produce un aumento en la concentración de DA y 5-HT durante el desarrollo postnatal en las regiones encefálicas estudiadas (Keller y col. 1973; Loizou y Salt 1970; Noisin y Thomas 1988; Nomura y col. 1976; Parés-Herbuté y col. 1989; Porcher y Heller 1972; Rodríguez de Fonseca y col. 1991; Roth y col. 1980; Siddiqui y col. 1989; Watts y Stanley 1984) y en encéfalo entero (Agrawal y col. 1966; Karki y col. 1962). Esta subida no se mantiene hasta la edad adulta para el DOPAC, confirmando resultados previos (Keller y col. 1973; Rodríguez de Fonseca y col. 1991; Roth y col. 1980). Hemos encontrado resultados similares a éste último para el metabolito de degradación de la serotonina (el 5-HIAA) lo que concuerda lo encontrado

por otros autores en el área preóptica y el rafe mesencefálico (Watts y Stanley 1984). El perfil del otro metabolito de la DA estudiado (el HVA) que presenta un pico a los 14 días y un descenso hacia la edad adulta, coincide con la evolución observada previamente en el cuerpo estriado y encéfalo completo (Keller y col. 1973). También es concordante con la literatura el resultado del descenso de los valores de la tasa DOPAC/DA con la edad hacia la edad adulta, obteniéndose el valor máximo en una edad más temprana (Rodríguez de Fonseca y col. 1991; Roth y col. 1980 [deducido de sus datos]). Si bien nosotros encontramos el máximo a los 7 días, mientras que en los trabajos citados aparece a los días 22 y 3, respectivamente. Por lo que se refiere HVA/DA, las variaciones encontradas por nosotros (un pico en la segunda semana y valores más bajos en el adulto) son muy parecidas al perfil descrito para el cuerpo estriado en un trabajo anterior (Keller y col. 1973). En nuestro estudio hemos observado descenso en los valores hacia la edad adulta para el índice 5-HIAA/5-HT, con valores máximos al día 14 en estriado y mesencéfalo y a 7 y 14 en hipotálamo. Otros autores han encontrado también este descenso en la proporción de 5-HIAA frente a 5-HT en el hipotálamo entre ratas de 12 días y de 90 (Siddiqui y col. 1989 [deducida de sus datos]). También en estudios en el área preóptica hipotalámica y el rafe mesencefálico -midiendo a las 36 horas del nacimiento y a los 4, 12, 40 y 80 días- se observaron menores niveles hacia la edad adulta, encontrando el máximo al día 4 (Watts y Stanley 1984). Por lo que se refiere a las concentraciones de 5-HT en las distintas áreas, también está de acuerdo con la literatura el que las concentraciones de 5-HT sean claramente mayores en el mesencéfalo que en el hipotálamo durante las dos primeras semanas de desarrollo (Watts y Stanley 1984), aunque ya no hacia

el destete y en el adulto, en que otros autores ven que prácticamente se igualan (Watts y Stanley 1984) o, al igual que nosotros, observan que son superiores en el hipotálamo (Bardo y col. 1982; Baron y col. 1985; Sharma y col. 1988). Además, es coincidente asimismo que, a su vez, las concentraciones de 5-HT en mesencéfalo e hipotálamo sean superiores a las encontradas en el cuerpo estriado, tanto a lo largo del desarrollo (Bardo y col. 1982; Nomura y col. 1976), como en ratas adultas (Baron y col. 1985; Nomura y col. 1976; Sharma y col. 1988). Los incrementos entre las edades en estas dos zonas mencionadas son similares a los de trabajos anteriores (Nomura y col. 1976; Watts y Stanley 1984), con la excepción de los importantes incrementos encontrados por nosotros entre los días 7 y 14, que no aparecen en el estudio de Nomura y colaboradores, y son menos marcados en el trabajo de Watts y Stanley. Estas diferencias podrían atribuirse a las diferente técnica de valoración y disección empleadas por estos autores. Las elevadas concentraciones de DA en estriado, así como sus aumentos relativos con la edad, también concuerdan con lo observado por otros autores (Nomura y col. 1976; Rodríguez de Fonseca y col. 1991; Roth y col. 1980). Estas observaciones nos permitirían hablar de unas relativas tendencias generales en el desarrollo posnatal de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en las estructuras estudiadas.

Como ya se mencionó al comienzo, muchos de los trabajos anteriores sobre el desarrollo de estos sistemas se han realizado en machos o en sexos mezclados, por lo que no hay tanta cantidad de información disponible sobre diferencias sexuales. No se encontraron en nuestro estudio diferencias sexuales para DA, DOPAC, DOPAC/DA a



ninguna de las edades, lo que confirma los resultados de un trabajo reciente en el que se valoraron estos mismos parámetros también durante el desarrollo postnatal y se empleó además la misma técnica (HPLC con detección electroquímica) (Rodríguez de Fonseca y col. 1991). Nosotros también valoramos HVA, otro metabolito de degradación de la DA, y aquí sí encontramos una diferencia sexual a los 22 días de edad: los machos mostraron mayores concentraciones de HVA y mayor índice HVA/DA. Ello podría ser indicativo de diferencias en los mecanismos de degradación extracelular en machos y hembras a esta edad, puesto que se considera que el HVA se degrada en el exterior de la neurona (Roffler-Tarlov y col. 1971; Westerink 1985). Podría reflejar una distinta liberación de DA, aunque las concentraciones de DOPAC no variaron, y se piensa que el HVA es principalmente un *segundo metabolito* de la DA (Westerink 1985). Finalmente, la diferencia podría estar en los mecanismos de eliminación de HVA del encéfalo [DOPAC y HVA son eliminados por transporte activo dependiente de energía (Westerink 1985)].

Es mayor el número de trabajos existentes sobre diferencias sexuales en el sistema serotoninérgico. Así, algunos autores han encontrado diferencias en la concentración de 5-HT en hipotálamo a los 12 días (mayores niveles en las hembras) (Gladue y col. 1977; Siddiqui y col. 1989) e incluso, más concretamente, en el área preóptica medial (Simerly y col. 1984). En cambio en otros trabajos no se observaron tales diferencias sexuales en el hipotálamo (Wilson y Agrawal 1979) en el área preóptica ni en los núcleos del rafe del mesencéfalo (Watts y Stanley 1984). Otros autores han encontrado diferencias del mismo tipo en el hipotálamo a los 14 días (las hembras mayores concentraciones de 5-HT y 5-

HIAA que los machos), pero no en el resto de los días entre el 10 y el 16 de vida postnatal (Wilson y col. 1986) y menores concentraciones de 5-HIAA (pero no de 5-HT) (Wilson y col. 1986) y de 5-HT (Wilson y Agrawal 1979) en el mesencéfalo de las hembras. Se ha llegado incluso a hablar de dos períodos de diferencias sexuales en el sistema serotoninérgico, puesto que se encontró que los niveles de 5-HT y de actividad descarboxilasa encefálicas serían mayores en las hembras 1 y 2 de vida además de en el día 12 [Hardin 1973ab (en encéfalo entero); Ortega-Corona y col. 1979 (en hipotálamo)], aunque esto no siempre se ha podido confirmar [Ladowski y Gaziri 1970 (en encéfalo entero); Wilson y Agrawal 1979 (en hipotálamo); Watts y Stanley 1984 (en área preóptica y rafe mesencefálico)]. En nuestro trabajo se encontraron a los 7 días menores concentraciones de 5-HIAA en mesencéfalo para las hembras. No se encontraron diferencias sexuales significativas a esta edad en hipotálamo, aunque las hembras presentaron unos valores un 4% mayores que los machos. Estos resultados estarían en consonancia con los trabajos primeramente citados (especialmente el de Wilson y col. 1986), sólo que las diferencias aparecen antes en nuestro estudio (a los 7 días frente al día 14). Además, en nuestro trabajo encontramos a los 22 días mayores valores para los machos de 5-HT y 5-HIAA en el hipotálamo y mesencéfalo, pero no en el estriado, lo que confirma a aquellas dos zonas como más específicamente sexo-dimórficas para este sistema. Nuestros datos sugieren la posibilidad de otra nueva edad a la que pueden manifestarse diferencias sexuales en el sistema serotoninérgico. En este sentido, se han propuesto edades posteriores en que estas diferencias podrían aparecer durante el desarrollo postnatal. Así, Watts y Stanley en 1984 encontraron una mayor tasa de recambio de

serotonina en machos que en hembras a los 40 días de edad en el área preóptica hipotalámica, mientras que no detectaron diferencias sexuales a los días 4, 12 y 20. Dado que nosotros encontramos estas diferencias a los 22 días en el hipotálamo completo (así como en mesencéfalo), podría ser que esta distancia de dos días fuera importante para la manifestación de diferencias sexuales, puesto que se trata de la época del destete. La explicación para los distintos resultados podría estar también en las diferentes zonas abarcadas por la disección en cada caso (área preóptica hipotalámica e hipotálamo entero).

Existen un gran número de evidencias a partir de estudios bioquímicos y autorradiográficos (Illes y Jackisch 1991; Murrin y col. 1980; Nakazawa y col. 1991; Pollard y col. 1977), así como fisiológicos (Barón y col.; Clouet y Ratner; Hoehe y Duka 1993; Kamata 1987; Rosecrans y col. 1977; Steece y col. 1986; Yaksh y Tyce 1979) y electrofisiológicos (Finnerty y Chan 1981; Hommer y Pert 1983; Jurna 1981) realizados en la edad adulta que indican claramente la coexistencia e interrelaciones funcionales recíprocas entre los sistemas monoaminérgicos y el SOE en diversas regiones encefálicas. Los efectos de las sustancias opioides sobre los sistemas de monoaminas, y muy en particular sobre el sistema dopaminérgico en estriado e hipotálamo, parecen depender de la región encefálica concreta que se trate, del tipo de receptor implicado y, en ocasiones, también de la ruta de administración. Por otra parte, parece que las acciones analgésicas de los opioides dependerían de su capacidad de activar el sistema serotoninérgico a nivel mesencefálico. Estos hechos sugieren que los opioides endógenos podrían modular los sistemas monoaminérgicos mencionados y que la manipulación opioide durante el desarrollo

postnatal podría producir alteraciones en dichos sistemas. Sin embargo, esta presunción no ha podido ser corroborada con anterioridad a nuestro trabajo respecto al bloqueo funcional opioide. Así, otros autores no han sido capaces de encontrar modificaciones en los niveles de noradrenalina, dopamina o serotonina en diversas regiones del encéfalo (entre ellas cuerpo estriado, mesencéfalo e hipotálamo) por tratamiento diario con naloxona en ratas de 22 días (Bardo y col. 1982). Nosotros, en cambio, sí hemos encontrado diversas diferencias en las tres estructuras estudiadas en distintas edades, incluyendo el día 22. Dado que también inyectan diariamente la misma dosis de antagonista (aunque la naloxona la administraron dos veces por día) y, al igual que nosotros, estos autores también valoran al día siguiente de la última inyección, es posible que el hecho de que nosotros sí observemos efectos se deba a que el compuesto empleado por nosotros -la naltrexona- produce un bloqueo opioide de mayor duración. Los propios autores de aquel trabajo indican esta posibilidad.

Sí existe evidencia de un posible efecto de los agonistas opioides sobre el sistema dopaminérgico durante diversas edades del desarrollo postnatal. En concreto, se ha observado que la administración de morfina durante este período en crías de rata produce incrementos significativos de los niveles de DOPAC una hora y media más tarde, desde el día 6 (pero no al día 3), hasta la edad adulta, alcanzando su mayor efecto al día 15 (Roth y col. 1980). Es difícil establecer comparaciones entre nuestro trabajo y el anteriormente citado, dado que el tratamiento es distinto y además se emplea un agonista. A pesar de ello, los resultados de Roth y colaboradores al igual que los nuestros indican

que existe una modulación opioide sobre el sistema dopaminérgico en el estriado también durante el período predestete. Además, debe resaltarse que la edad a la que estos autores encuentran mayor efecto (los 15 días) prácticamente coincide con la edad a la que se observaron mayor número de diferencias significativas debidas al tratamiento para este sistema en el presente trabajo (al día 14). Hay que señalar que no siempre se han comprobado los efectos del tratamiento con morfina en el desarrollo. Otros autores, utilizando una dosis inferior e inyectando a las ratas diariamente desde el día 1, no encontraron ningún efecto sobre la dopamina ni en una estimación de la tasa de recambio (basada en la utilización de la  $\alpha$ -metiltirosina, inhibidor de la tirosina hidroxilasa) en ninguna de las regiones encefálicas que examinaron (incluyendo el estriado (Bardo y col. 1982).

En ratas adultas, han podido comprobarse efectos del bloqueo opioide crónico durante ocho días utilizando implantes subcutáneos de naltrexona (Barón y col. 1985; Sharma y col. 1988). En el primero de los mencionados trabajos se observaron elevaciones en el contenido de DA en córtex frontal y estriado en los animales tratados, sin que se encontraran modificaciones de los niveles de noradrenalina ni de 5-HT en esas regiones ni de noradrenalina, DA y 5-HT en ninguna de las otras que estudiaron (incluyendo hipotálamo y sustancia gris periacueductal). Por lo que se refiere al estudio de Sharma y colaboradores, estos autores encontraron aumentos en la tasa de recambio DOPAC/DA en hipocampo dorsal y 5-HIAA/5-HT en corteza frontal, pero no vieron diferencias en ninguna otra de las regiones que examinaron (que incluían cuerpo estriado, hipotálamo y

sustancia gris periacueductal). El hecho de que en el primero de los trabajos nada más midieran los neurotransmisores (Barón y col. 1985) reduce las posibilidades de comparación, ya que nosotros, por ejemplo, en animales neonatos al día 7 (7 días de tratamiento subcrónico) no encontramos variaciones en los niveles de DA en estriado, pero sí en los de HVA en esta misma zona. En nuestro trabajo sólo encontramos un aumento de DA en estriado por el tratamiento con naltrexona a los 14 días en la subpoblación *B* (en la subpoblación *A* hubo descenso de DA). Algo similar sucede con respecto al segundo estudio (Sharma y col. 1988) en el que sólo se suministran los datos correspondientes a la tasa de recambio, por ejemplo nosotros en la edad adulta no encontramos variación en el índice 5-HIAA/5-HT en estriado, aunque sí las hubo en cada uno de los dos factores por separado. Sin embargo, sí podríamos afirmar que los efectos del bloqueo opioide con naltrexona sobre las regiones encefálicas son distintos en el animal adulto dependiendo de si es tratado en la edad adulta o durante el período predestete. Además, parecería que la sensibilidad, o las consecuencias de dicho tratamiento son distintas en el animal predestete y en el adulto en las diferentes regiones del encéfalo. Este hecho podría deberse, al menos en parte, a la diferente sensibilidad de los receptores opioides durante el desarrollo a la administración crónica de sustancias opioides. Así, se ha visto que la administración de naloxona (1mg/Kg dos veces al día) incrementa el número de receptores en estriado, hipotálamo, médula espinal y córtex cerebral en animales de 22 días, pero no en ratas adultas (Bardo y col. 1983). Es posible que ello sea debido a una menor capacidad del hígado de los neonatos para metabolizar los fármacos (Moreland y col. 1980). Sin embargo, la duración de los efectos sobre el número de sitios de unión opioide es menor

en los neonatos que en los adultos. Mientras que los incrementos producidos en este parámetro por el tratamiento crónico con naloxona (1mg/Kg dos veces al día) en ratas de 22 días desaparecen por completo una semana más tarde, en adultos se mantiene un incremento del 40% al menos una semana después de finalizar el tratamiento con naloxona (10mg/Kg diarios durante 4 semanas) (Lahti y Collins 1978) y con naltrexona (implantes subcutáneos durante 8 días) esta elevación del 40% se mantiene todavía a los 8 días de eliminar los implantes (Baron y col. 1985; Tempel y col. 1982). Por su parte el tratamiento crónico desde el día 1 con un agonista opioide como la morfina (inyección diaria de 5mg/Kg) es capaz de hacer descender los niveles del receptor  $\mu$  opioide al nacimiento y día 5, pero no a los 14 y 28 días (Tempel y col. 1988) y tampoco parece tener efecto sobre el conjunto de los receptores opioides al día 22 (Bardo y col. 1982).

Según nuestros datos, el sistema dopaminérgico en el estriado se vería afectado por el tratamiento con naltrexona a las edades más tempranas estudiadas (7 y 14 días), aunque posteriormente ya no se encontraron efectos al final del tratamiento (día 22) ni quedarían secuelas en la edad adulta. El sistema serotoninérgico, por contra, no se vió afectado en ninguna de las tres regiones estudiadas hasta la segunda semana de vida y se encontraron alteraciones a los 22 días y en el adulto. Ello podría interpretarse como un posible patrón distinto de maduración -al menos, en relación con la sensibilidad al tratamiento- en un sistema y otro en las áreas estudiadas. Según esto, se podría pensar que el sistema dopaminérgico en el estriado maduraría antes en relación a la modulación opioide que el sistema serotoninérgico en las otras estructuras, y por ello mostraría una respuesta al

tratamiento en una edad más temprana (los 7 días). Siguiendo con esta interpretación, al estar este sistema más maduro en este aspecto, sería menos plástico, por lo que el efecto tendría menor inercia (sólo hasta el día 14). Otra posibilidad sugerida por trabajos in vitro, sería la implicación de distintos subtipos de receptores para los distintos sistemas, con distinta capacidad de adaptarse a la exposición al fármaco (ver Steece y col. 1986). Cabe mencionar, en apoyo de una distinta sensibilidad del sistema serotoninérgico durante el desarrollo, el hecho de que otros autores hayan encontrado que la inhibición de la síntesis de serotonina durante la segunda semana postnatal -pero no durante la primera- afecta a diversos parámetros comportamentales en la edad adulta (Farabollini y col. 1988). Estos resultados estarían además en consonancia con que en nuestro trabajo el sistema serotoninérgico sólo haya mostrado variaciones debidas al tratamiento a partir de la segunda semana.

Con relación a este tema, sería interesante señalar que se considera que las regiones más caudales del encéfalo maduran antes que las más anteriores (Jacobson 1978) y se han encontrado indicios de ello para las catecolaminas en relación con la modulación opioide (Roth y col. 1980) y en el desarrollo de los propios receptores opioides (Bardo y col. 1981, 1982). Aunque también hay datos discordantes respecto a los receptores y los péptidos opioides endógenos (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987), y en concreto se ha visto que el desarrollo de la dinorfina y la  $\beta$ -endorfina (ambos péptidos opioides endógenos) sería más rápido en el estriado que en el hipotálamo (Bayon y col. 1979; Loughlin y col. 1985; McDowell y Kitchen 1987). No es posible llegar a conclusiones



respecto al sistema dopaminérgico dado que sólo se valoró en una de las estructuras. Por otro lado, las áreas estudiadas están quizá muy próximas en el encéfalo como para esperar grandes diferencias. Sin embargo hay que señalar que en el mesencéfalo (la más caudal de las regiones estudiadas) ya no se encontraron diferencias significativas para el tratamiento en la edad adulta, lo que quizá sea indicativo de un desarrollo relativamente más rápido, y por ello de una plasticidad algo menor, que le llevaría a presentar menor inercia en los efectos. Esta visión se vería respaldada por el hecho de que la concentración de 5-HT ya no aumenta significativamente entre el día 22 y la edad adulta en mesencéfalo en los animales controles (y sí en las otras estructuras), lo que podría indicar que se alcanzarían antes los niveles del adulto en esta región encefálica. Estos datos son coincidentes con los de un trabajo anterior en el se estudió en paralelo en el área preóptica hipotalámica y en la región del rafe mesencefálico y en el que no se encontraron mayores niveles para la serotonina entre los 20 y los 80 días en la región mesencefálica y sí en el área preóptica (Watts y Stanley, 1984). Además, y en relación con la hipótesis anterior, se ha descrito que la maduración del sistema serotoninérgico en el hipotálamo, en contraste con el mesencéfalo, no está tan avanzada y la formación de los terminales se extiende a través de las tres semanas de vida postnatal (Lidov y Molliver 1982ab). El desarrollo de la red serotoninérgica hipotalámica durante esta etapa podría ser la razón de los mayores incrementos en la concentración de 5-HT en hipotálamo observados por nosotros, en comparación con el mesencéfalo y particularmente entre 7 y 22 días.

Por otra parte, los cambios producidos por el tratamiento en los dos sistemas

monoaminérgicos objeto de nuestro estudio parecen ser hasta cierto punto compensatorios de una edad a la siguiente estudiada. Así, en el sistema dopaminérgico el tratamiento incrementa los niveles de HVA y HVA/DA en el cuerpo estriado a los 7 días, mientras que a los 14 días disminuyen ambos parámetros en la subpoblación *A* y ya no hay diferencias significativas en la subpoblación *B*. Además en esta segunda subpoblación aumenta la concentración de DA, sin que varíe la de DOPAC, lo que en cierto modo indica un efecto contrapuesto (quizá menor degradación/liberación de DA). En el sistema serotoninérgico sucede algo similar. Mientras a los 14 días descienden las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en las tres regiones para la subpoblación *A* y en mesencéfalo e hipotálamo para la subpoblación *B* a causa del tratamiento, al día 22 el efecto frente a los controles es de aumento de la concentración de 5-HIAA en todas las estructuras y de 5-HT en estriado. Por último las consecuencias del tratamiento neonatal con naltrexona en la edad adulta son de descenso de los niveles de 5-HT y 5-HIAA tanto en estriado como en hipotálamo, mientras que el efecto ya no es significativo en mesencéfalo. Este tipo de fluctuaciones en el efecto de un tratamiento durante el desarrollo ya ha sido observado por otros autores sobre diversas variables (Bardo y col. 1983; Fukuda y col. 1977; Zadina y col. 1985; Tempel y col. 1988; Rodríguez-de Fonseca y col. 1992), y por nosotros mismos en otro apartado anterior de esta Tesis Doctoral (ver sección IV.1.2.2 del apartado IV.1.2 *Aislamiento sexual y  $\beta$ -FNA*). Es más, algunos de estos autores han postulado ya la existencia de estos mecanismos compensatorios durante el desarrollo para las catecolaminas (Fukuda y col. 1977) y el sistema serotoninérgico (Farabollini y col. 1988). En algunos trabajos anteriores se ha indicado que tras el cese del bloqueo opioide se produce una

supersensibilidad del sistema por un aumento del número de receptores consecuencia del tratamiento (Bardo y col. 1982, 1983; Sharma y col. 1988; Tempel y col. 1985) posiblemente acompañada de niveles elevados de opioides endógenos (Bardo y col. 1982, 1983; Sharma y col. 1988; Tempel y col. 1985; Zagon y McLaughlin 1984). Estos cambios podrían contribuir a explicar al menos algunas de las mencionadas fluctuaciones a lo largo del desarrollo. En cualquier caso nuestros datos apoyan la idea de que el sistema opioide podría ejercer una modulación tónica sobre los sistemas monoaminérgicos durante el desarrollo. Asimismo, los presentes resultados indican que los efectos del bloqueo transitorio del SOE durante el período predestete sobre los sistemas monoaminérgicos pueden mostrar inercia hasta la edad adulta.

Los cambios encontrados a cada edad por efecto del tratamiento pueden atribuirse en general a posibles modificaciones en la actividad del sistema -especialmente en el sistema serotoninérgico- dado que suelen afectar a la tasa de recambio y/o al metabolito de degradación (aunque la 5-HT también varíe tiene más peso el cambio en el metabolito, excepto en el hipotálamo de los adultos y en el estriado a los 22 días). Sin que de ningún modo se excluya esta explicación para los efectos del tratamiento neonatal con naltrexona sobre el sistema dopaminérgico, la interpretación para los resultados en este sistema se complica. En primer lugar se trata de dos metabolitos de degradación, uno de formación intraneuronal (el DOPAC) y otro de formación extracelular (el HVA). Además, ambos compuestos son conjugados a sulfatos y eliminados del encéfalo por transporte activo (Ganong 1989, Westerink 1985). Por ello mientras que la influencia del tratamiento sobre

el sistema serotoninérgico puede atribuirse a fenómenos intrínsecamente neuronales, aunque se vean afectadas la recaptación y la degradación del neurotransmisor, en el caso del sistema dopaminérgico la naltrexona podría ejercer su efecto extraneuronamente. De hecho, se ha sugerido que diversas drogas que actúan a nivel central tendrían un efecto importante sobre el transporte de DOPAC y HVA hacia afuera del encéfalo (Westerink 1985). Por otro lado debemos advertir que no se ha valorado otro metabolito extracelular conocido de la DA, la 3-metoxitiramina (3-MT), que también puede metabolizarse finalmente a HVA, si bien parece que el 90% de la DA se cataboliza por la vía del DOPAC (Westerink 1985).

Por último, debemos señalar el hecho interesante de haber encontrado subpoblaciones respecto al efecto del tratamiento con naltrexona a los 14 días de edad. Un hecho similar ha sido encontrado por otros autores para el tratamiento crónico con naltrexona en la edad adulta para los sistemas noradrenérgico y dopaminérgico en distintas regiones encefálicas (Sharma y col. 1988). Estos resultados se han interpretado como diferencias interindividuales en los niveles de aferencia opioide a estas regiones. En nuestro caso es muy posible que esa sea también la explicación, aunque dado que se nos ha producido este fenómeno en una edad que parece muy crítica (según nuestros resultados y los de otros autores) para el desarrollo postnatal, es también factible que pequeñas diferencias interindividuales o intercamada en el perfil ontogenético de estos sistemas pudieran, asimismo contribuir a explicar el distinto efecto encontrado para el tratamiento en las dos subpoblaciones.

#### IV.3 ESTUDIOS COMPORTAMENTALES: TRATAMIENTO CON NALTREXONA

[Salvo que se indique lo contrario, los niveles de significación especificados entre paréntesis en las siguientes secciones corresponden a los resultados del análisis de varianza. Para el análisis *post-hoc* de Duncan el nivel de significación fue fijado en  $p < 0.05$ ) (ver sección III.6.3 sobre *Análisis estadístico*)]

##### IV.3.1 TABLERO DE AGUJEROS

Como ya se indicó en el apartado III.4.3.1 de técnicas experimentales, se recogieron y analizaron de forma independiente lo que previamente definimos como *deambulación externa* y *deambulación interna* para el tablero de agujeros. En lo que se refiere a la deambulación externa, no aparecieron diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles. Por contra, los animales tratados con naltrexona mostraron valores de deambulación interna significativamente más bajos que los controles ( $p < 0.01$ ), tanto los machos como las hembras (Tabla 20). Aparecieron diferencias sexuales significativas en ambas pautas, que indicaron una mayor deambulación de las hembras para los dos parámetros. Sin embargo, esta diferencia fue más clara en el caso de la deambulación externa ( $p < 0.01$ ) que en el de la deambulación interna ( $p < 0.05$ ), y sólo para la primera se hizo significativa en el análisis *post-hoc*, tanto para los animales controles como tratados (Fig. 24).

Los parámetros más representativos de esta prueba, la exploración de agujeros y el tiempo de exploración, se vieron afectados por el tratamiento y en el mismo sentido (Tabla 20; Fig. 25). En el caso de la exploración de agujeros el análisis de varianza reveló un efecto significativo general del tratamiento ( $p < 0,05$ ), mostrando los animales tratados un menor número de exploraciones. Ni el sexo ni la interacción de ambos factores fueron significativos. El análisis post-hoc no encontró diferencias entre los grupos, dando a entender que el efecto sólo alcanza significación estadística al considerar machos y hembras conjuntamente. En clara concordancia con estos resultados, el tiempo de exploración también fue menor en los animales tratados ( $p < 0,001$ ). Esta diferencia sólo fue significativa para las hembras tratadas al comparar grupo por grupo con el análisis de Duncan. Sin embargo, la tendencia en los machos tratados con naltrexona es claramente la misma, por lo que es posible que la falta de significación se deba más a un fenómeno de dispersión de datos que a un diferente efecto según el sexo. El hecho de que la interacción tratamiento x sexo no fuera significativa parece apoyar esta suposición. Sí fueron significativas ( $p < 0,05$ ) las diferencias sexuales *per se*: las hembras controles pasaron más tiempo explorando los agujeros que los machos controles (Fig. 25).

El tratamiento con naltrexona no afectó significativamente al número posturas erguidas realizadas por los animales a lo largo de la prueba (Tabla 20). En cambio sí hubo una clara diferencia entre los grupos de machos y los de hembras ( $p < 0,01$ ), mostrando estas últimas un mayor número que los machos, tanto entre los grupos tratados como entre los controles (Fig. 26). Consecuentemente con todo lo anterior, la interacción tratamiento

x sexo no fue significativa.

La tasa de defecación no presentó variaciones significativas en esta prueba (Tabla 20).

En resumen, podemos decir que el tratamiento con naltrexona, en general, hizo descender tanto la frecuencia como el tiempo de exploración de agujeros, así como la deambulación por el interior del recinto de prueba. Sin embargo, no pareció alterar la deambulación externa, la postura erguida ni la defecación. En cuanto a las diferencias sexuales, las hembras mostraron mayores niveles de deambulación, tanto interna como externa, pasaron más tiempo explorando los agujeros y realizaron mayor número de posturas erguidas.

#### IV.3.2 CAMPO ABIERTO

Los datos recogidos durante las tres sesiones de campo abierto se procesaron mediante un análisis de varianza de 3 vías -siendo los factores tratamiento, sexo y día de prueba- con el fin de valorar el efecto de, y sobre, la repetición de la prueba. Los factores *tratamiento* y *sexo* afectaron de forma significativa a todas las variables estudiadas, bien *per se* (DE:  $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$ ; DI:  $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$ ; PE:  $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$ ; DEF:  $p < 0,001$  y  $p < 0,0001$ ) y/o como interacción (TI: *tratamiento* =  $p < 0,0001$ , *tratamiento x sexo* =  $p < 0,01$ ; AR: *tratamiento x sexo* =  $p < 0,01$ ). Además, dicho análisis reveló que la mayoría de los parámetros se vieron modificados significativamente dependiendo del día de prueba. Tal es el caso de las deambulaciones externa ( $p < 0,01$ ) e interna ( $p < 0,001$ ), tasa de postura erguida ( $p < 0,05$ ) y tiempo de inmovilidad ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, el atusamiento rostral y la tasa de defecación mostraron un patrón similar de variación con independencia de cual de las tres sesiones de campo abierto se tratara. Por esta razón, el primer grupo de variables (deambulaciones externa e interna, tasa de postura erguida y tiempo de inmovilidad) se analizaron posteriormente por grupos experimentales (♂ CONTR, ♀ CONTR, ♂ NALTX, ♀ NALTX) en cada uno de los tres días de prueba separadamente. Para ello se utilizó el análisis de Duncan con una significación fijada en  $p < 0,05$ . Además, dentro de cada uno de los mencionados grupos experimentales, se estudió la evolución de cada parámetro a lo largo de las tres sesiones, para observar el efecto de la exposición repetida a la prueba. Al tratarse en este caso de comparar valores del mismo animal en los distintos días, se analizaron las diferencias empleando la prueba de *t* de



Student para datos apareados. Para éste análisis sí se especificará el nivel de significación.

El primer día de campo abierto es considerado, desde el punto de vista comportamental, distinto del resto por representar la primera vez que los animales se someten a la prueba, con el componente neofóbico que esto conlleva. Por ello, expondremos a continuación de forma separada los resultados de la primera sesión de campo abierto (deambulaciones externa e interna, tasa de postura erguida y tiempo de inmovilidad), posteriormente el análisis en conjunto de la tasa de defecación y el atusamiento rostral, ya que no presentaron variación con el día de prueba, y, finalmente, la evolución a lo largo de los tres días de prueba de aquellas variables mencionadas en primer lugar que sí la presentaron.

#### IV.3.2.1 Primer día de prueba

El tratamiento neonatal con naltrexona redujo la deambulación interna y la tasa de postura erguida, mientras que aumentó el tiempo de inmovilidad (Tabla 21ab, Figs. 27 y 28). En el caso de la deambulación interna el efecto sólo fue significativo en las hembras, aunque los machos tratados también mostraron valores menores que los controles.

Las hembras, tanto tratadas como controles, presentaron mayor deambulación externa que los grupos de machos (Fig. 27). Asimismo, las hembras controles deambularon más por el interior del recinto (Fig. 27) y mostraron mayor número de posturas erguidas

que los machos controles (Fig. 28).

El tratamiento no afectó significativamente a la deambulación externa (Tabla 21a, Fig. 27).

#### IV.3.2.2 Parámetros que no variaron con la repetición de la prueba

##### \* Tasa de defecación:

Como ya se indicó al principio de este apartado, la tasa de defecación no varió significativamente durante las sesiones, por lo que se analizaron las sumas de los datos obtenidos para cada animal en las tres sesiones. El efecto del tratamiento con naltrexona sólo fue significativo en las hembras: las tratadas mostraron mayor tasa de defecación que las controles (Tabla 22, Fig 29). Por otra parte los grupos de machos tanto tratados como controles presentaron valores más altos que los correspondientes grupos de hembras (Fig. 29).

##### \* Atusamiento rostral:

Tampoco para esta variable se encontró variación estadísticamente significativa a lo largo del período de prueba, por lo que también en este caso el análisis se hizo sobre la suma de los datos obtenidos en los tres días. Sí fue significativa la interacción

*tratamiento x sexo*: se observó un distinto efecto del tratamiento según el sexo de los animales. Mientras en los machos el tratamiento aumentó el número de atusamientos rostrales, en las hembras lo disminuyó (Tabla 22, Fig. 29). Como reflejo de ello, los machos tratados mostraron valores significativamente mayores que los controles. Aunque la diferencia no resultó significativa, las hembras tratadas presentaron un número de atusamientos rostrales casi la mitad que las controles. Indirectamente, esta diferencia se pone de manifiesto por la significación encontrada para los menores valores de las hembras tratadas frente a los machos tratados con naltrexona (Fig. 29). Los machos y hembras controles no difirieron significativamente.

#### IV.3.2.3 Efectos de la repetición de la prueba

##### \* Deambulación externa:

Los machos controles no presentaron variaciones entre el primer día y el segundo. El tercer día presentó un descenso significativo frente a los valores los dos primeros días ( $p < 0,05$ ) (Tabla 21a, Fig. 30). Por su parte, los machos tratados con naltrexona mostraron durante los días segundo y tercero de prueba valores significativamente más bajos que los que presentaron en la primera sesión ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,001$  respectivamente). No hubo variación entre los dos últimos días. Las hembras controles no variaron sus niveles de deambulación externa durante los tres días de prueba. Se produjo un significativo descenso

gradual en los valores de este parámetro para las hembras tratadas los días segundo y tercero ( $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). No hubo diferencias significativas entre los valores de los dos días últimos. Convendría reseñar que la bajada llegó a ser de un 28% en el tercer día frente al primero, similar en magnitud a los descensos encontrados en los machos.

Como consecuencia de estas variaciones, se pudieron observar en el segundo día de prueba unos menores valores de deambulación externa para los animales tratados, que ya fue significativo en el caso de los machos (Tabla 21a). Al día tercero este descenso debido al tratamiento sólo fue significativo entre los grupos de hembras. La pérdida de significación para los machos parece deberse a la bajada que se produce en los controles al tercer día de prueba, y no a una falta de efecto del tratamiento en este día.

Las hembras en general siguieron presentando mayores valores de deambulación externa que los machos. Estas diferencias alcanzaron significación en el segundo día para las hembras tratadas y en el tercero para los controles.

\* Deambulación interna:

Se observaron importantes y significativos descensos con respecto al primer día en los grupos de machos para la deambulación interna presentada durante las sesiones segunda y tercera (Tabla 21a). Estas bajadas fueron del 47 y 77%, respecto al primer día, para los

machos controles ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ) y del 90 y 61% ( $p < 0,0001$  y  $0,01$ ) para los machos tratados, en los días segundo y tercero respectivamente. Los dos últimos días no difirieron significativamente entre sí en ninguno de los dos grupos. En cuanto a las hembras, tanto tratadas como controles, se observan pequeñas disminuciones en sus valores de deambulación interna los días segundo y tercero de prueba, aunque esta variación no llega a hacerse significativa respecto de los valores obtenidos el primer día en las hembras tratadas ( $p = 0,063$  y  $p = 0,065$ , respectivamente) y sólo es significativa en el segundo día en las controles ( $p < 0,05$  y  $p = 0,083$  días segundo y tercero, respectivamente).

Durante los dos últimos días de prueba tan sólo se detectó una diferencia significativa debida al tratamiento (entre hembras tratadas y controles el tercer día) (Tabla 21a). Las ausencias de significación se pueden explicar por el fenómeno general de bajada de la deambulación interna a lo largo de la prueba, especialmente marcado en los machos.

Las diferencias sexuales fueron significativas entre los controles en el día tercero de prueba y al segundo día entre los tratados, mostrando las hembras siempre valores mayores que los machos.

\* Tasa de postura erguida:

La tasa de postura erguida presentada por los grupos controles va descendiendo gradualmente a lo largo de los tres días (Tabla 21b). En las hembras controles la bajada

frente a los niveles del primer día es significativa el último día de prueba ( $p < 0,01$ , con un descenso del 26%), aunque el día segundo ya se observa una bajada del 19%. Los machos presentaron descensos significativos los días segundo y tercero ( $p < 0,05$ , una bajada del 24%; y  $p < 0,0001$ , descenso del 43%, respectivamente). Por su parte, tanto los machos como las hembras de los grupos tratados con naltrexona no presentan variaciones significativas durante los tres días de prueba. Una posible explicación para este hecho puede ser el que ya desde el primer día presentaron valores muy bajos, inferiores incluso a los de sus controles al tercer día.

En el segundo día de prueba los animales tratados, tanto machos como hembras, presentaron menores tasas de postura erguida que sus controles respectivos al igual que sucedía el primer día de prueba, aunque las diferencias en terminos absolutos se redujeron (Tabla 21b). Finalmente, el día tercero de prueba la significación se pierde entre los grupos de machos. Ello sucede a causa del descenso que se produce en la tasa de postura erguida en los machos controles al tercer día y no por una pérdida del efecto o recuperación en los machos tratados. La diferencia entre tratadas y controles se mantiene en las hembras dado que la bajada en las controles a lo largo de la prueba no es tan grande, en términos absolutos, como en los machos controles (un 26 %, frente a un descenso del 43 % en los machos controles al tercer día).

Las hembras controles presentaron tasas de postura erguida significativamente mayores que los machos a lo largo de todos los días de prueba. No se encontraron

diferencias entre machos y hembras tratados.

\* Tiempo de inmovilidad:

Los machos controles presentaron una tendencia a aumentar su tiempo de inmovilidad a partir de la segunda sesión (Tabla 21b, Fig. 30). Esta variación no resultó estadísticamente significativa al segundo día, aunque cabe reseñar que el valor de la media se cuadruplicó. Sí lo fue al día tercero ( $p < 0,05$ ) en que este valor se sextuplicó. La ausencia de significación al día segundo podría deberse a lo bajo de los valores y a la dispersión de los mismos. Los machos tratados presentaron tiempos de inmovilidad significativamente mayores a los presentados el primer día tanto en la segunda ( $p < 0,0001$ ) como en la tercera sesiones ( $p < 0,01$ ). La tendencia de variación en las hembras controles no fue clara: presentaron una elevación al segundo día y al tercero un descenso frente al primer día de prueba. Ninguna de estas variaciones fue significativa. En cuanto a las hembras tratadas con naltrexona, mostraron una elevación el segundo ( $p < 0,05$ ) y tercer días ( $p < 0,05$ ) frente a los valores obtenidos en la primera sesión. Hay que señalar que la elevación de la inmovilidad en este grupo con respecto al primer día fue de un 101 % en la segunda sesión y de un 63 % en la tercera.

Los grupos de animales tratados con naltrexona presentaron valores de inmovilidad significativamente mayores que sus controles correspondientes de cada sexo tanto al segundo como al tercer días de prueba, al igual que sucedía el día primero (Tabla 21b).

Las diferencias sexuales comienzan a apuntarse al día segundo, pero no fueron significativas. Solamente al tercer día los tiempos de inmovilidad de los machos controles fueron significativamente mayores que los obtenidos para las hembras controles. La interacción *tratamiento x sexo* se debe a que las hembras controles no experimentan un descenso significativo a lo largo de la prueba.

Como resumen podemos decir que, en general, la repetición de la prueba supuso un descenso de las deambulaciones externa e interna y de la tasa de postura erguida exhibidas por los animales, mientras que el tiempo de inmovilidad que mostraron se incrementó a lo largo de los tres días de prueba. Sin embargo, estas tendencias generales en el caso de la deambulación externa y el tiempo de inmovilidad fueron significativas desde el segundo día para machos y hembras tratados con naltrexona, mientras que las hembras controles no mostraron variación y los machos controles solamente la presentaron al día tercero. En lo que se refiere a la deambulación interna, el descenso en los niveles de esta pauta los días segundo y tercero se dio claramente en los grupos de machos, tratados y controles, aunque las hembras controles mostraron una bajada significativa el segundo día. El descenso en el número de posturas erguidas sólo apareció de forma significativa en los grupos controles. La repetición de la prueba no afectó significativamente a los niveles de atusamiento rostral o tasa de defecación presentados por los animales durante las tres sesiones.



#### IV.3.3 LABERINTO EN CRUZ

Los efectos del tratamiento sobre los parámetros medidos en esta prueba fueron muy claros y consistentes entre sí. El número de entradas que los animales tratados, tanto machos como hembras, realizaron a los brazos abiertos, así como el tiempo que permanecieron en los brazos abiertos, fueron muy significativamente inferiores a los que se encontraron para sus correspondientes grupos controles ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) (Tabla 23, Fig. 31). No hubo diferencias significativas debidas al tratamiento en cuanto al número de entradas a los brazos cerrados (Tabla 23, Fig. 32). Sin embargo, el tiempo que los animales tratados con naltrexona permanecieron en los brazos cerrados fue superior al de los controles ( $p < 0,001$ ) (Tabla 23).

En concordancia con estos resultados, el porcentaje de entradas a brazos abiertos/total fue inferior en los grupos tratados ( $p < 0,001$ ), al igual que también fue menor el porcentaje de tiempo que permanecieron en los brazos abiertos ( $p < 0,001$ ) (Tabla 24, Fig. 31). Además los animales tratados con naltrexona presentaron un mayor porcentaje de tiempo en los brazos cerrados que sus controles respectivos ( $p < 0,001$ ) (Tabla 24).

Por otra parte, ni el número de entradas total ni el tiempo total en los brazos se vieron afectados significativamente por el tratamiento (Tabla 24, Fig. 32).

Podemos decir, en resumen, que los animales tratados con naltrexona exploraron

menos los brazos abiertos y permanecieron más tiempo en los brazos cerrados. El hecho de que no se encontraran diferencias significativas respecto al tratamiento para el número de entradas total ni para el tiempo total en los brazos indica que las diferencias encontradas para los otros parámetros no se deben a una menor actividad general de los animales tratados.

El análisis de varianza sólo reveló diferencias sexuales significativas para el número de entradas en brazos cerrados ( $p < 0,05$ ) (Fig. 32) y, posiblemente como consecuencia de ello, para el número de entradas total ( $p < 0,05$ ). En ambos casos, las hembras presentaron valores mayores que los machos. Hay que reseñar, sin embargo, que para el análisis *post-hoc* sólo fueron significativas las diferencias sexuales entre los grupos tratados. La no significación en los controles cabe atribuirse a dispersión de datos, dado que la tendencia es la misma y no fueron significativos ni el tratamiento ni la interacción *tratamiento x sexo* para ninguno de los dos parámetros.

Finalmente, cabe mencionar que, al analizar los datos con la prueba de *t* de Student, el número de veces que los animales controles, tanto machos como hembras, entraron en los brazos abiertos no fue significativamente distinto del número que entraron en los cerrados. Sí fue significativamente mayor el tiempo que permanecieron en los brazos cerrados frente al tiempo en los abiertos ( $p < 0,05$  para los machos controles;  $p < 0,001$  para las hembras controles). Respecto a los animales tratados con naltrexona, fueron significativamente mayores tanto el número de veces que se adentraron en los brazos

cerrados ( $p < 0,001$  los machos y  $p < 0,0001$  las hembras) como el tiempo que permanecieron en su interior ( $p < 0,0001$  tanto para los machos como para las hembras).

#### IV.3.4 TABLAS Y GRÁFICAS

**TABLA 20**

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO PREDESTETE CON NALTREXONA SOBRE LA ACTIVIDAD EN EL TABLERO DE AGUJEROS EN LA EDAD ADULTA

	DE	DI	EA	TE(seg.)	PE	DEF
$\sigma\sigma$						
CONTR	125,5 $\pm$ 10,2	55,8 $\pm$ 3,7	15,8 $\pm$ 1,1	38,7 $\pm$ 4,0	23,3 $\pm$ 2,1	2,1 $\pm$ 0,6
NALTX	126,9 $\pm$ 8,9	41,1 $\pm$ 3,1*	13,5 $\pm$ 1,2	26,8 $\pm$ 2,3	19,0 $\pm$ 1,7	3,4 $\pm$ 0,7
$\varphi\varphi$						
CONTR	162,8 $\pm$ 12,6	65,4 $\pm$ 5,9	16,8 $\pm$ 1,1	54,9 $\pm$ 6,6	30,7 $\pm$ 2,4	2,6 $\pm$ 0,7
NALTX	151,8 $\pm$ 11,0	50,3 $\pm$ 4,8*	13,3 $\pm$ 1,2	30,4 $\pm$ 4,7*	26,2 $\pm$ 2,9	2,8 $\pm$ 0,8

Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 16-17 observaciones. \*p<0,05 frente al grupo control correspondiente (prueba de Duncan).

## Efectos del tratamiento con NALTX

### Prueba del tablero de agujeros

#### Deambulaci3n externa e interna

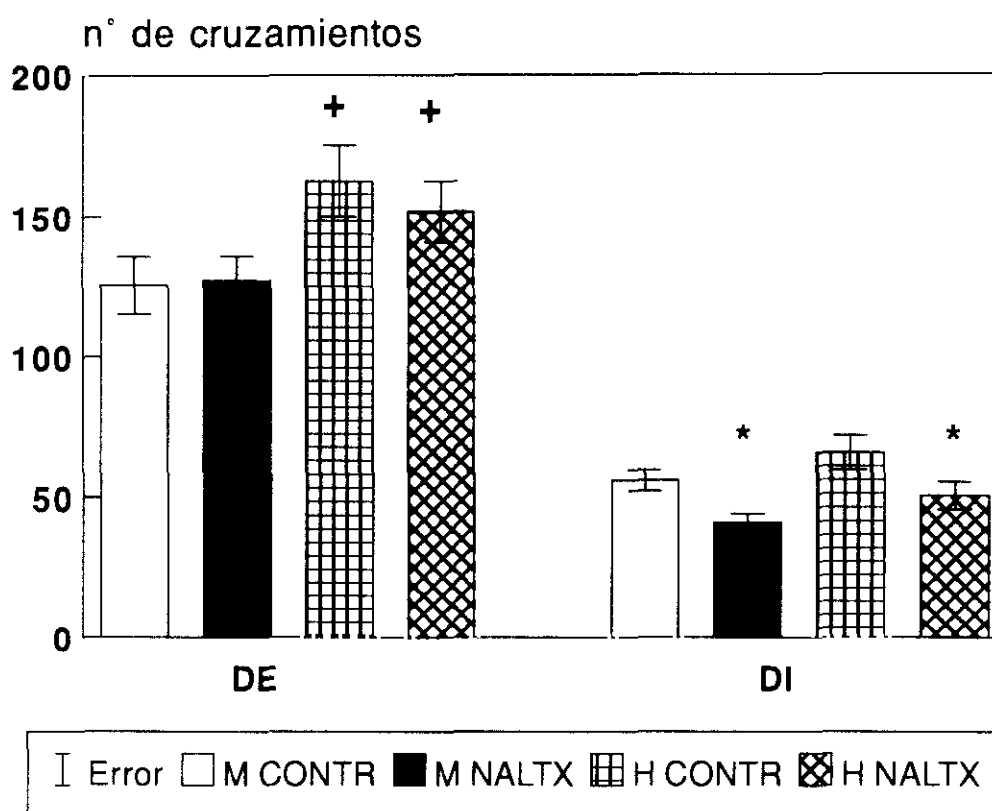


FIG. 24. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 16-17 observaciones.  
 \* $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo control; + $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo de machos (prueba de Duncan)

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Prueba del tablero de agujeros

### Exploración de agujeros y tiempo de exploración

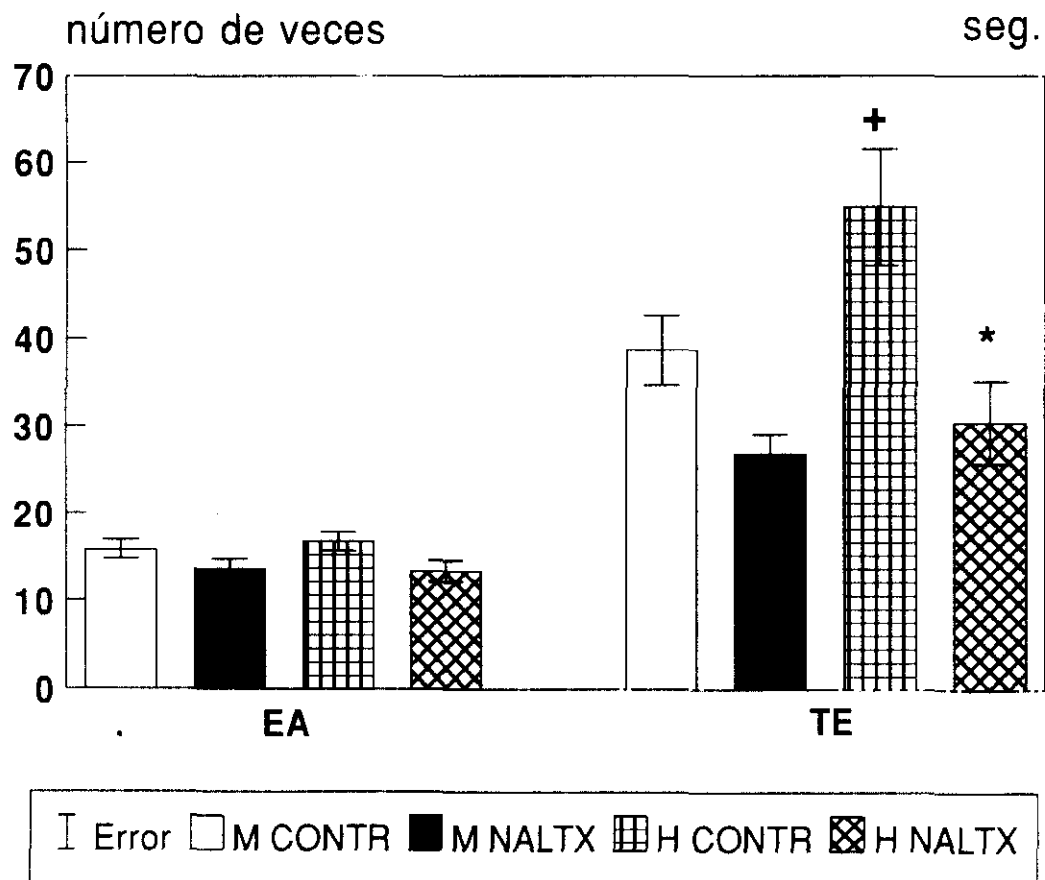


FIG. 25. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 16-17 observaciones.  
<sup>\*</sup>p<0,05 frente al correspondiente grupo control; <sup>+</sup>p<0,05 frente al correspondiente grupo de machos (prueba de Duncan)

## Efectos del tratamiento con NALT Prueba del tablero de agujeros

### Postura erguida

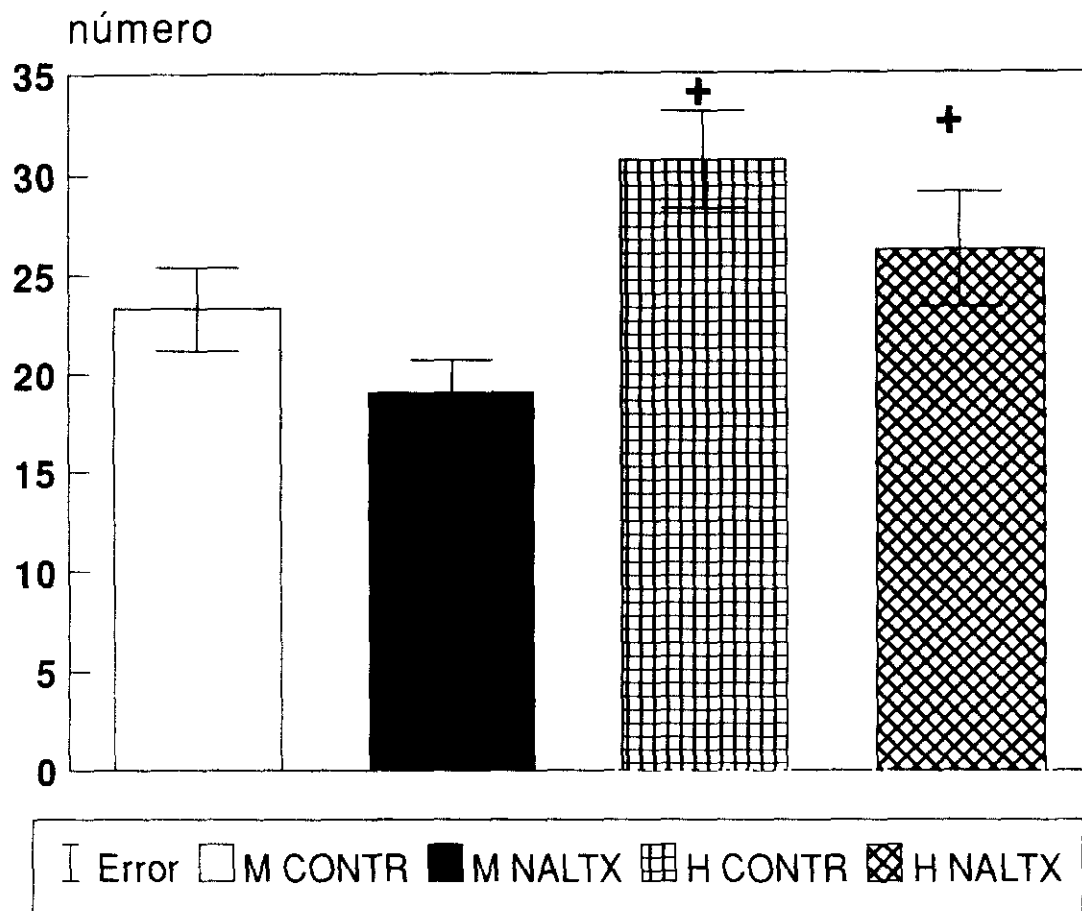


FIG. 26. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 16-17 observaciones. + $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo de machos (prueba de Duncan)



**TABLA 21a**  
**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO PREDESTETE CON NALTREXONA SOBRE LA ACTIVIDAD EN EL CAMPO**  
**ABIERTO EN LA EDAD ADULTA. I. PARÁMETROS QUE VARÍAN SIGNIFICATIVAMENTE CON LA REPETICIÓN**  
**DE LA PRUEBA**

	DE			DI		
	1 <sup>er</sup> día	2 <sup>o</sup> día	3 <sup>er</sup> día	1 <sup>er</sup> día	2 <sup>o</sup> día	3 <sup>er</sup> día
♂♂						
CONTR	45,4±3,1	44,6±4,7	33,3±4,3 <sup>r</sup>	6,4±1,5	3,4±1,2 <sup>r</sup>	1,5±0,5 <sup>rr</sup>
NALTX	42,6±4,0	28,9±4,4 <sup>*rrr</sup>	29,0±4,2 <sup>rrr</sup>	4,1±0,7	0,4±0,2 <sup>rrr</sup>	1,6±1,0 <sup>rr</sup>
♀♀						
CONTR	62,4±3,9	56,0±5,1	60,5±3,5	13,4±2,6	8,5±2,5 <sup>r</sup>	8,4±2,3
NALTX	56,6±4,9	47,7±6,2 <sup>r</sup>	40,8±4,9 <sup>*rrr</sup>	5,9±1,0 <sup>*</sup>	3,7±1,2	3,9±2,0 <sup>*</sup>

Los valores representan la media ± e.e.m. de 16-17 observaciones. \*p<0,05 frente al grupo control correspondiente del mismo día (prueba de Duncan). <sup>r</sup>p<0,05; <sup>rr</sup>p<0,01; <sup>rrr</sup>p<0,001; <sup>rrrr</sup>p<0,0001 frente al valor observado el primer día en el mismo grupo experimental (prueba t de Student apareada).

**TABLA 21b**

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO PREDESTETE CON NALTREXONA SOBRE LA ACTIVIDAD EN EL CAMPO ABIERTO EN LA EDAD ADULTA. I. PARÁMETROS QUE VARÍAN SIGNIFICATIVAMENTE CON LA REPETICIÓN DE LA PRUEBA (continuación)

	PE			TI(seg.)		
	1 <sup>er</sup> día	2 <sup>o</sup> día	3 <sup>er</sup> día	1 <sup>er</sup> día	2 <sup>o</sup> día	3 <sup>er</sup> día
♂♂						
CONTR	12,9±1,5	9,8±1,7 <sup>r</sup>	7,3±1,1 <sup>mm</sup>	3,2±0,9	12,3±4,5	19,0±7,2 <sup>r</sup>
NALTX	5,5±0,7*	4,9±1,0*	6,1±1,1	14,6±3,7*	36,9±6,3 <sup>*mm</sup>	33,5±7,0 <sup>*r</sup>
♀♀						
CONTR	19,1±1,8	15,4±1,9	14,1±1,0 <sup>r</sup>	3,8±2,2	6,2±3,2	1,3±0,8
NALTX	9,4±1,6*	8,6±1,6*	7,7±1,3*	21,9±3,9*	44,0±8,8 <sup>*r</sup>	35,6±5,5 <sup>*r</sup>

Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 16-17 observaciones. \*p<0,05 frente al grupo control correspondiente (prueba de Duncan). <sup>r</sup>p<0,05; <sup>m</sup>p<0,01; <sup>mm</sup>p<0,0001 frente al valor observado el primer día en el mismo grupo experimental (prueba *t* de Student apareada).

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Prueba de campo abierto

### Deambulaci3n externa e interna (Primer d3a)

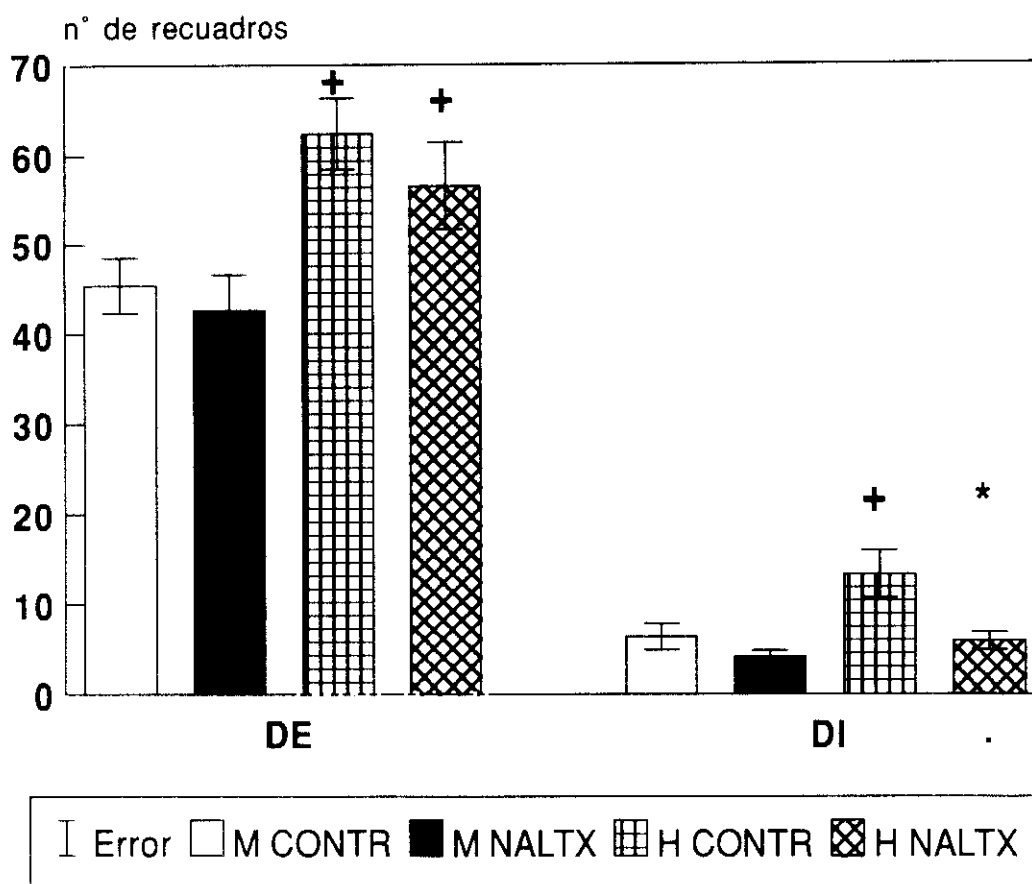
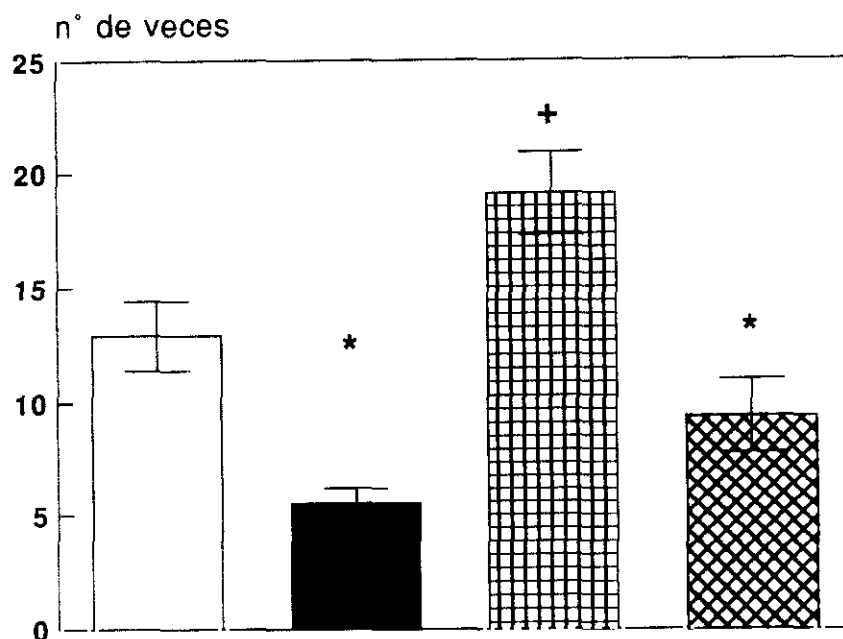


FIG. 27. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 16-17 observaciones.  
<sup>\*</sup> $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo control; <sup>+</sup> $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo de machos (prueba de Duncan)

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Prueba de campo abierto

### Postura ergida (Primer día)



### Tiempo de inmovilidad (Primer día)

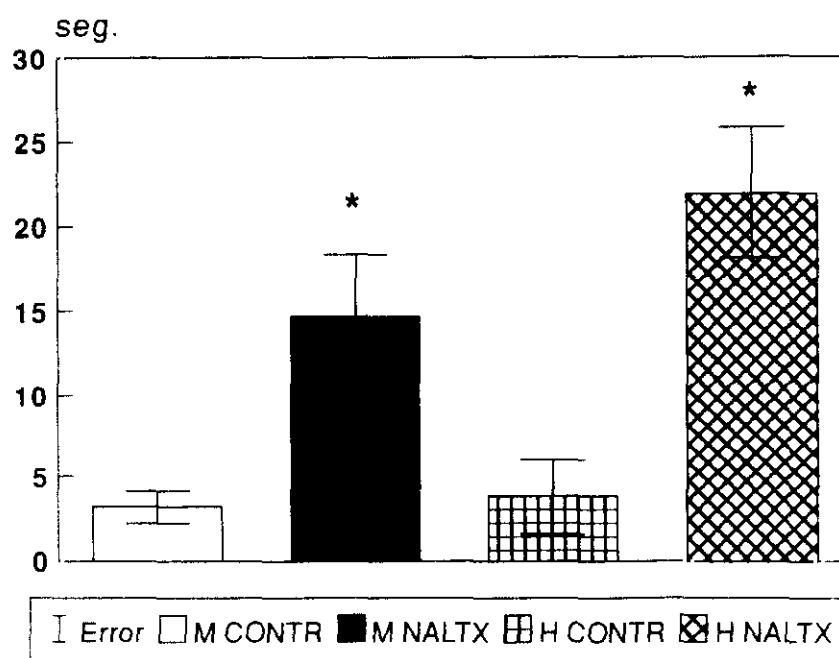


FIG. 28. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 16-17 observaciones.  
 \* $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo control; + $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo de machos (prueba de Duncan)

**TABLA 22**

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO PREDESTETE CON NALTREXONA SOBRE LA ACTIVIDAD EN EL CAMPO ABIERTO EN LA EDAD ADULTA. II. PARÁMETROS QUE NO VARÍAN SIGNIFICATIVAMENTE CON LA REPETICIÓN DE LA PRUEBA

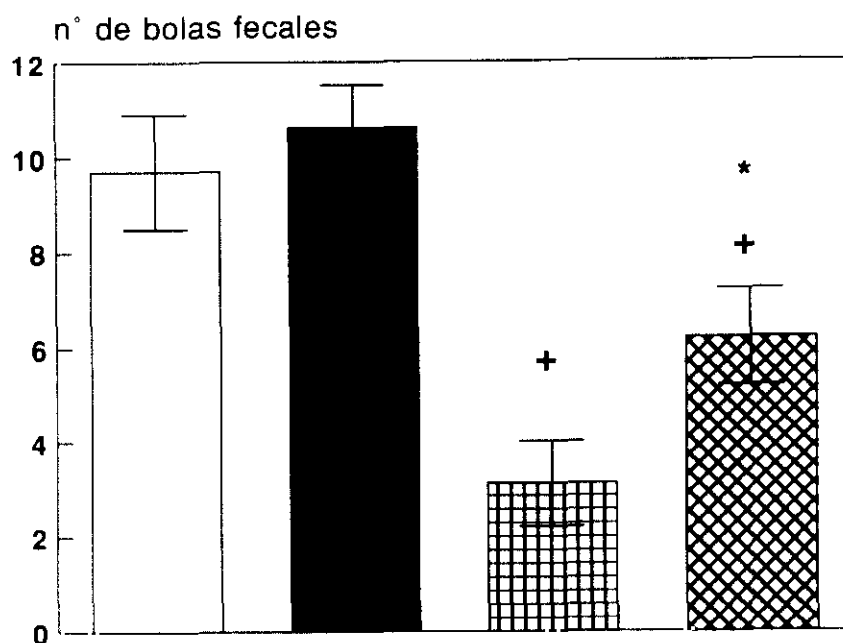
	DEF				AR			
	1 <sup>er</sup> día	2 <sup>o</sup> día	3 <sup>er</sup> día	TOTAL	1 <sup>er</sup> día	2 <sup>o</sup> día	3 <sup>er</sup> día	TOTAL
<i>♂♂</i>								
CONTR	3,5±0,5	3,2±0,6	3,0±0,6	<b>9,7±1,2</b>	0,8±0,3	0,9±0,3	2,0±0,6	<b>3,7±1,0</b>
NALTX	3,2±0,4	3,5±0,4	3,9±0,5	<b>10,6±0,9</b>	2,3±0,5	2,1±0,6	2,6±0,5	<b>6,9±1,0*</b>
<i>♀♀</i>								
CONTR	1,8±0,5	0,6±0,3	0,8±0,3	<b>3,1±0,9</b>	2,4±0,4	1,0±0,4	1,8±0,4	<b>5,3±0,5</b>
NALTX	2,4±0,4	1,9±0,5	2,3±0,6	<b>6,2±1,0*</b>	1,3±0,4	0,9±0,3	0,9±0,3	<b>2,9±1,0</b>

Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 16-17 observaciones. \*p<0,05 frente al grupo control correspondiente (prueba de Duncan).

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Prueba de campo abierto

### Defecación (Total)



### Atusamiento rostral (Total)

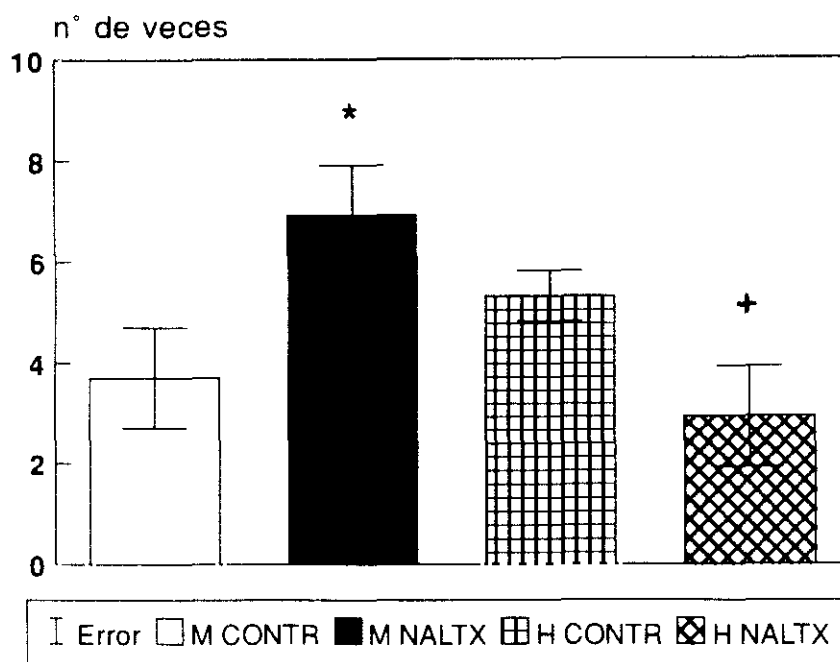
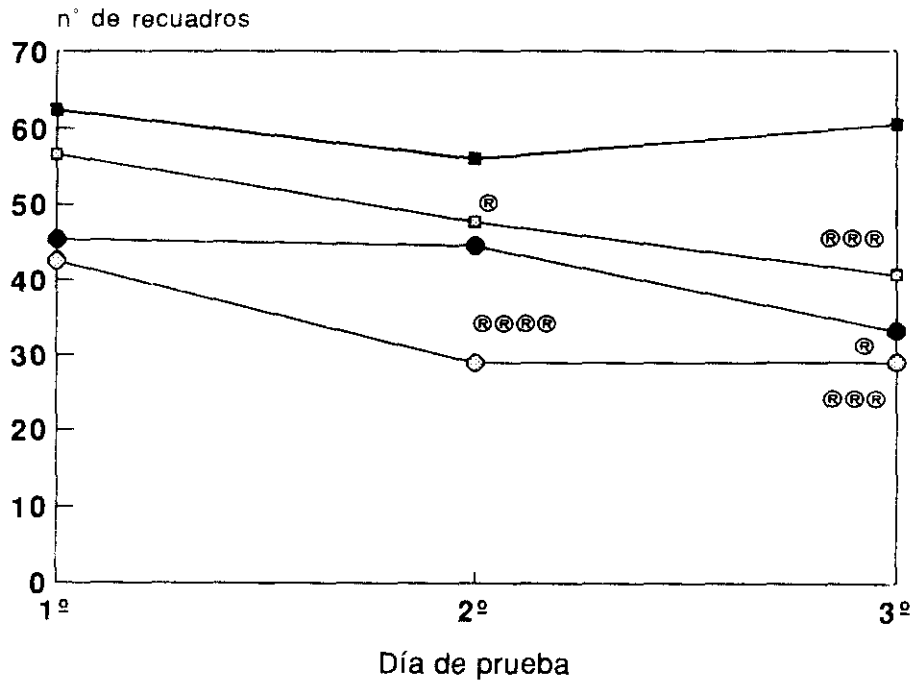


FIG. 29. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 16-17 observaciones.  
 \* $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo control; + $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo de machos (prueba de Duncan)

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Repetición de la prueba: selección representativa

### Deambulación externa



### Tiempo de inmovilidad

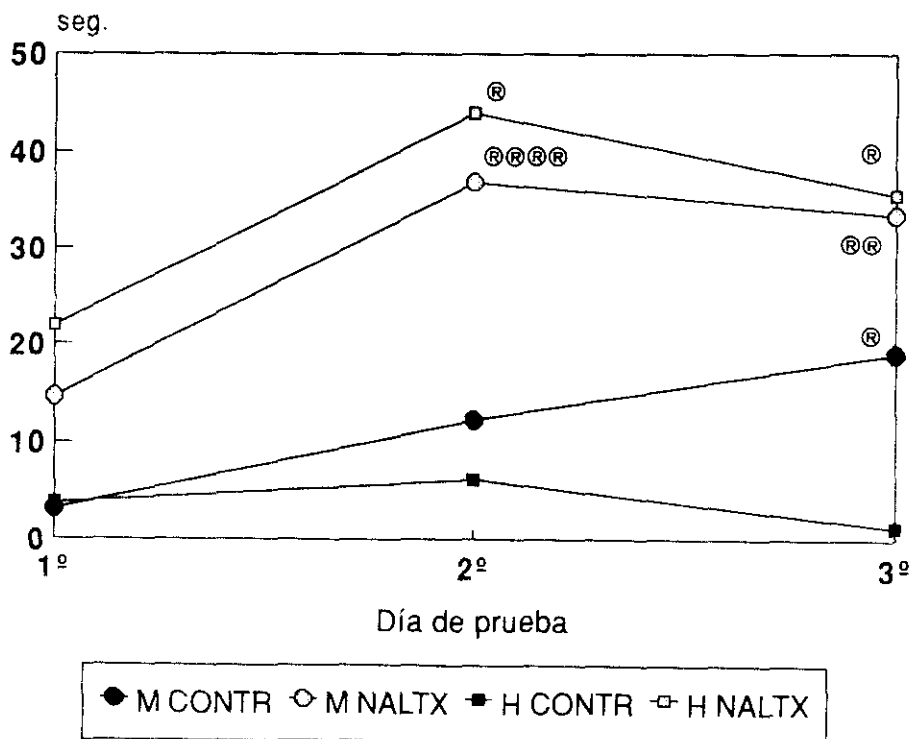


FIG. 30. Cada punto representa la media de 16-17 observaciones. @  $p < 0,05$ ; @@  $p < 0,01$ ; @@@  $p < 0,001$ ; @@@@  $p < 0,0001$  frente al valor encontrado el primer día para el mismo grupo experimental (prueba t de Student apareada)

**TABLA 23**  
**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO PREDESTETE CON NALTREXONA SOBRE LA**  
**ACTIVIDAD EN EL LABERINTO EN CRUZ EN LA EDAD ADULTA. I.**  
**PARÁMETROS PRIMARIOS**

	Eba	Tba(seg.)	Ebc	Tbc(seg.)
♂♂				
CONTR	9,9±0,8	97,5±16,2	9,4±0,7	139,0±12,8
NALTX	5,6±0,6*	56,7±11,7*	9,8±0,9	186,5±10,4*
♀♀				
CONTR	9,3±1,0	86,1±14,6	10,9±0,5	156,6±12,2
NALTX	6,8±1,0*	41,1±9,1*	12,6±1,1	197,0±9,3*

Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 14-16 observaciones. \* $p < 0,05$  frente al grupo control correspondiente (prueba de Duncan).



**TABLA 24**

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO PREDESTETE CON NALTREXONA SOBRE LA ACTIVIDAD EN EL LABERINTO EN CRUZ EN LA EDAD ADULTA. II. VARIABLES CALCULADAS

	%ba/tot	%Tba	%Tbc	Ttot	Etot
$\sigma\sigma$					
CONTR	51,4 $\pm$ 2,5	39,6 $\pm$ 5,5	60,4 $\pm$ 5,5	236,4 $\pm$ 12,4	19,4 $\pm$ 1,1
NALTX	35,6 $\pm$ 3,8*	22,3 $\pm$ 4,3*	77,7 $\pm$ 4,3*	243,2 $\pm$ 9,2	15,3 $\pm$ 1,1
$\varphi\varphi$					
CONTR	44,3 $\pm$ 3,3	34,6 $\pm$ 5,5	65,4 $\pm$ 5,6	242,7 $\pm$ 6,6	20,1 $\pm$ 1,1
NALTX	33,3 $\pm$ 4,3*	16,9 $\pm$ 3,7*	83,1 $\pm$ 3,7*	238,2 $\pm$ 7,0	19,4 $\pm$ 1,6

Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 14-16 observaciones. \*p<0,05frente al grupo control correspondiente (prueba de Duncan).

## Efectos del tratamiento con NALTX

### Prueba del laberinto en cruz

#### Entradas y % de tiempo en los brazos abiertos

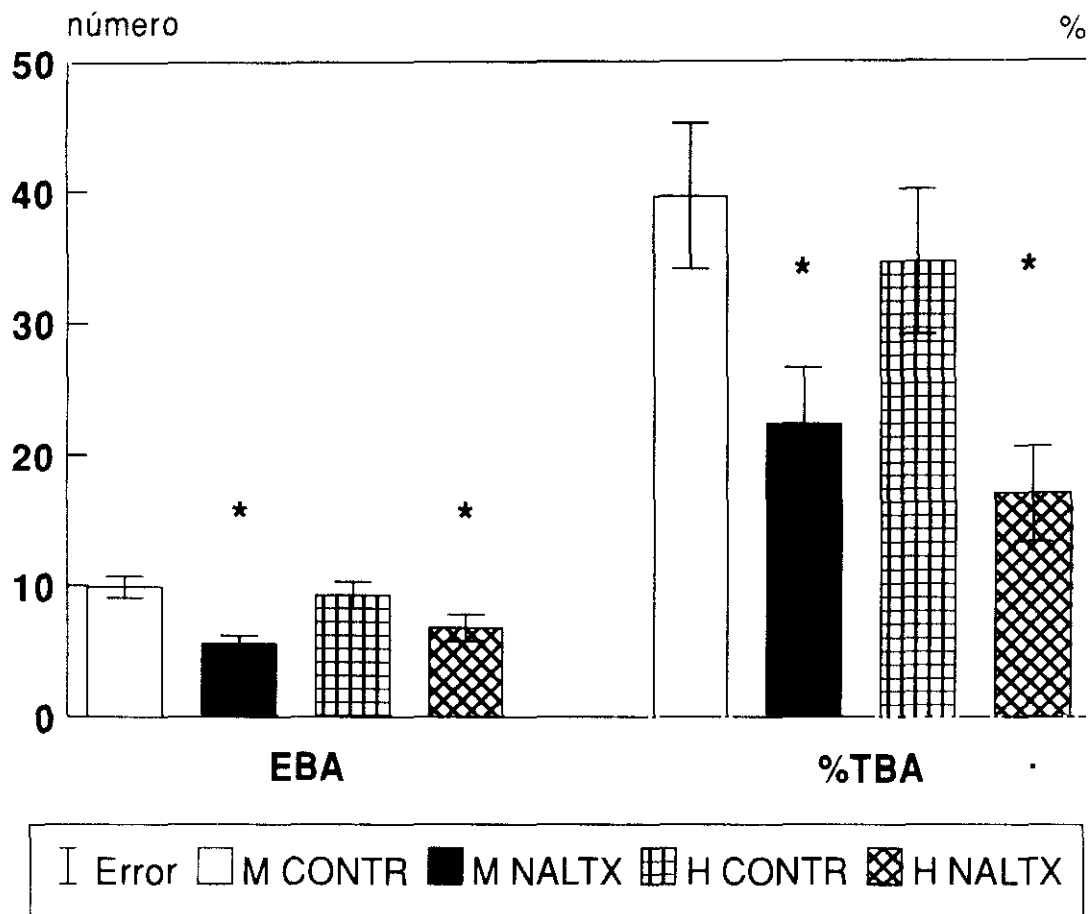
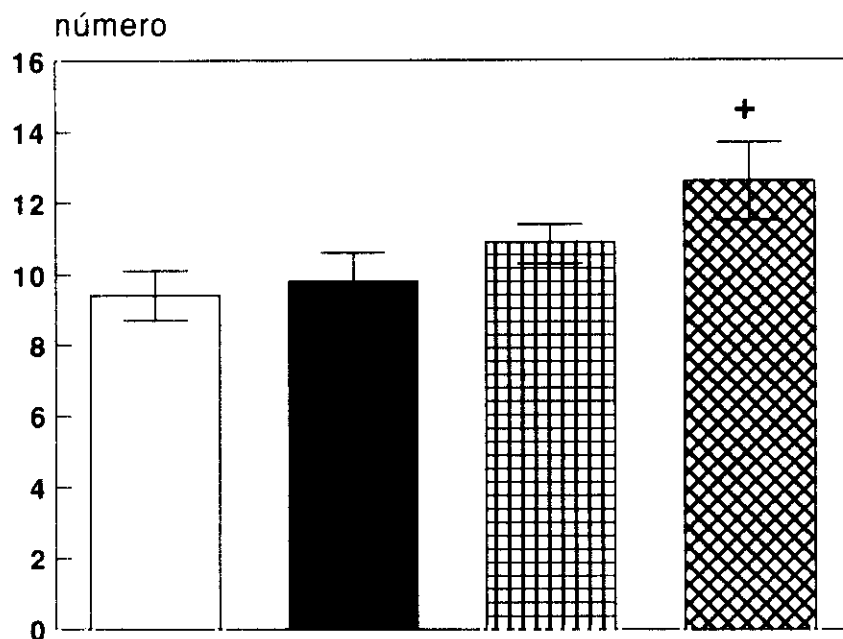


FIG. 31. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 14-16 observaciones.  
 \* $p < 0,05$  frente al correspondiente grupo control (prueba de Duncan)

# Efecto del tratamiento con NALTX

## Prueba de laberinto en cruz

### Entradas a los brazos cerrados



### Tiempo total explorando los brazos

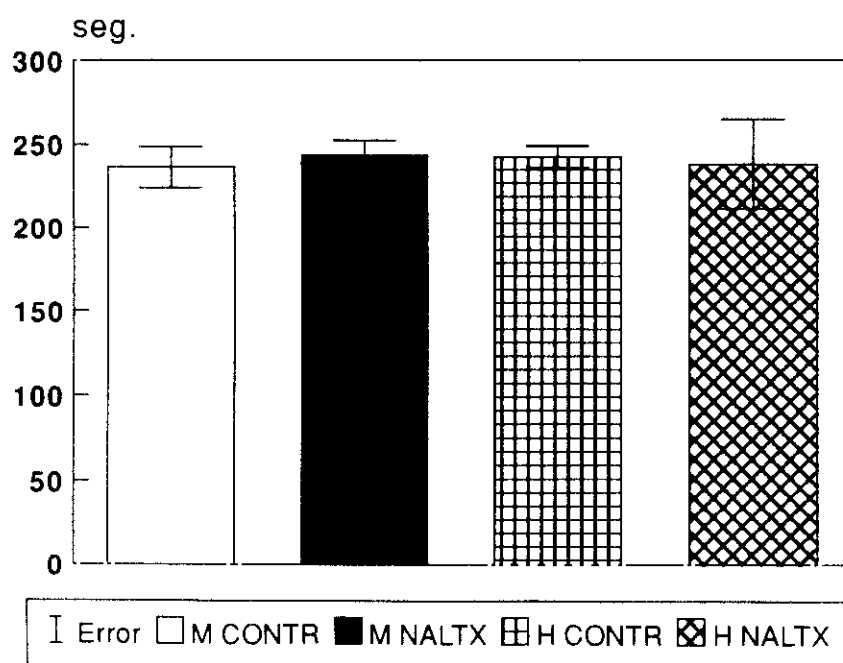


FIG. 32. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m. de 14-16 observaciones. +p<0,05 frente al correspondiente grupo de machos (prueba de Duncan)

#### IV.3.5 DISCUSIÓN

Los paradigmas comportamentales utilizados en este trabajo nos han permitido valorar numerosos parámetros en diversas situaciones ambientales relacionadas con la exploración, ansiedad o aversión. Se pretendió hacer un análisis comportamental exhaustivo, que reflejara claramente los efectos del tratamiento y que fuese lo menos artificioso posible. El hacer un estudio comportamental amplio resulta muy útil a la hora de valorar un tratamiento de este tipo, dado que el comportamiento supone una respuesta integrada y extraordinariamente compleja que implica el intercambio regulatorio entre diversas áreas del sistema nervioso central, cada una a cargo del control de diferentes aspectos comportamentales. Así, la aparición de un determinado cambio comportamental como respuesta a una situación ambiental implica interacciones en distintos niveles del sistema nervioso central, y sólo puede apreciarse con el estudio de un perfil comportamental suficientemente amplio (para discusión ver Kshama y col. 1990).

Las diferentes intensidades de estrés a las que fueron sometidos los animales en las diversas pruebas utilizadas y las distintas características de las mismas, nos han permitido valorar una serie de pautas indicativas de diversos aspectos del comportamiento: emotividad, ansiedad, exploración y actividad general o locomotora. Así, en el tablero de agujeros, paradigma de novedad/incertidumbre, los parámetros de exploración de agujeros y el tiempo de exploración son distintivos de esta prueba y se consideran como de exploración dirigida hacia un estímulo (Kshama y col. 1990; Lister 1987; Pellow y col.

1985; Steenbergen 1991; Wilson y col. 1991). Ambas pautas, como ya vimos, se vieron reducidas en los animales tratados neonatalmente con naltrexona. En este trabajo además hemos considerado de forma diferente la deambulaci3n interna de la externa en este aparato. Hemos atribuido un valor exploratorio al desplazamiento por la zona central, alrededor de los agujeros/est3mulo, si bien no podr3amos descartar *a priori* que indique tambi3n una menor emotividad dado que la rata es un animal tigmot3xico. Debemos se1alar, que por esta 3ltima interpretaci3n se han decantado otros autores en un trabajo realizado simult3neamente al nuestro (Albonetti y Farabollini 1992). La deambulaci3n externa, por la periferia del recinto y junto a la pared, ser3a un par3metro de locomoci3n. Es discutible sin embargo el valor atribuible a la tasa de postura erguida en esta prueba. Aunque se ha considerado a este par3metro como *exploratorio* en otras observaciones comportamentales (Meyerson y col. 1988; Kov3cs y De Wied 1978; Gray 1971a, 1991; Viveros y Hern3ndez 1988), en el tablero de agujeros, el hecho de que el animal realice esta pauta aparece como contrapuesto a la exploraci3n de agujeros, 3ndice exploratorio por antonomasia. Cabr3a en este caso considerar la tasa de postura erguida m3s como un par3metro de actividad general o, en todo caso, de exploraci3n inespec3fica, por contraposici3n a la exploraci3n dirigida representada en el hecho de explorar los agujeros/est3mulo; en este sentido apuntan los distintos trabajos que emplean esta prueba (File y Wardil 1975; Steenbergen y col. 1991; Wilson y col. 1991) . Finalmente, la tasa de defecaci3n tiene reconocido un valor de mayor emotividad (Blizard y col. 1975; Beatty 1979; Gray 1965, 1971ab, 1979ab, 1991; Gray y Lalljee 1974; Gray y col. 1965, 1969, 1975). De acuerdo con esto, los resultados obtenidos parecen indicar que el tratamiento

neonatal con naltrexona ha causado una disminución en aquellos parámetros claramente exploratorios como son la exploración de agujeros, tiempo de exploración y deambulación interna. Al no haberse visto alteradas por el tratamiento las pautas más asociadas a la actividad locomotora más general (deambulación externa, postura erguida), cabría hablar de una cierta especificidad del tratamiento en deprimir la actividad exploratoria dirigida. En este sentido, quizá es interesante recordar que el efecto del tratamiento con naltrexona sobre el tiempo de exploración sólo alcanzó significación estadística en las hembras, que a su vez exploraron más que los machos. Hay que hacer notar, no obstante, que los machos tratados también mostraron niveles apreciablemente más bajos que los controles, con lo que sería posible que la falta de significación se debiera a la dispersión de los datos.

La tasa de defecación no se vio afectada por el tratamiento. Esta ausencia de efecto concuerda, en cierta medida, con estudios anteriores en los que se ha observado que la tasa de defecación en el tablero de agujeros no era sensible a los tratamientos de estrés, aunque estos sí eran capaces de disminuir la exploración de los agujeros (Armario y col. 1991; García-Márquez y Armario 1987). Curiosamente, tampoco aparecieron diferencias sexuales en este parámetro, en contraste con lo encontrado hasta ahora en otro tipo de pruebas comportamentales (Beatty 1979; Blizard y col. 1975; Gray 1965, 1971ab, 1979ab, 1991; Gray y Lalljee 1974; Gray y col. 1965, 1969, 1975; Slob y col. 1981; Stewart y col. 1975). Si bien, en un trabajo reciente, en el que se empleó el tablero de agujeros, no se encontraron estas diferencias para la defecación entre los animales controles (Steenbergen y col. 1991). La conjunción de ambos resultados, unida a una tasa de defecación poco

elevada en general para todos los grupos, permite deducir que la prueba no resultó particularmente estresante para nuestros animales, de ahí que este parámetro no fuese sensible a ninguno de los dos factores que sí parecen estar relacionados con el grado de emotividad de los animales. En relación con esto, es interesante señalar que nuestros animales controles mostraron mayores niveles de exploración que los encontrados en otros trabajos para los animales controles (Kshama y col. 1990; Pellow y col. 1985; Steenbergen y col. 1991; Wilson y col. 1991). Además, se ha visto que los animales manipulados presentan valores más elevados de exploración de agujeros (File 1978b) y que los animales manipulados neonatalmente presentan menor emotividad (Ader y col. 1960; Ardila y col. 1977; Denenberg 1964; Denenberg y Zarrow 1971; Gray 1971ab, 1991; Levine 1962; Levine y col. 1956, 1967; Meaney y col. 1985). Todo ello parece reforzar la presunción de que la capacidad de respuesta de nuestros animales ante esta prueba -realizada en las condiciones descritas- pudo verse facilitada debido a los procedimientos neonatales utilizados.

Los mayores niveles de deambulación interna y externa, tiempo de exploración de agujeros y tasa de postura erguida mostrados por las hembras indican su mayor capacidad locomotora y exploratoria frente a los machos. Estos resultados están de acuerdo con lo esperado según otros estudios comportamentales anteriores que ponen de manifiesto esta mayor actividad de las hembras (Archer 1975; Broadhurst 1957; Beatty 1979; Beatty y Fessler 1976; Blizard y col. 1975; González y Leret 1992; Gray 1965, 1971ab, 1979ab, 1991; Gray y col. 1965, 1969, 1975; Meyerson y col. 1988; Price y Huck 1976; Slob y col.

1981, 1986; Studelska y Beatty 1978; Valle y Bols 1976; Viveros y Hernández 1988; Wilson y col. 1991), aunque últimamente también han aparecido datos discordantes, en cuanto a los animales controles, para el tablero de agujeros (Albonetti y Farabollini 1992; Steenbergen y col. 1991). El tratamiento con naltrexona no parece interferir con las diferencias sexuales mostradas por los animales para las pautas medidas en esta prueba.

Convendría señalar, que los distintos resultados obtenidos para la deambulación externa e interna en el tablero de agujeros parecen justificar plenamente el hecho de haber introducido la medición por separado de dichos parámetros. El que no se haya encontrado efecto del tratamiento con naltrexona para la deambulación externa, y sí un claro y significativo descenso de la deambulación interna en los animales tratados, indica claramente la conveniencia de esta separación para la investigación de los efectos de un tratamiento de estas características. Asimismo, estos resultados podrían confirmar el distinto componente exploratorio que proponíamos, ya que el tratamiento con el antagonista opiode, a la vista de los otros resultados, parece afectar a los parámetros más relacionados con la exploración que con la actividad general.

Los resultados encontrados para el primer día de prueba de campo abierto, así como para las pautas que no se modificaron con la repetición, concuerdan de forma clara con el panorama comportamental visto anteriormente para el tablero de agujeros. También en esta sesión de campo abierto se observó que mientras el parámetro más relacionado con la locomoción o actividad general -la deambulación externa- no resultó afectado por el



tratamiento neonatal con naltrexona, sí lo fueron aquellas pautas consideradas indicativas del grado de emotividad ante la prueba (deambulaci3n interna, tiempo de inmovilidad, defecaci3n y atusamiento rostral). Adem1as, este efecto fue (con la excepci3n del atusamiento rostral en las hembras) en el sentido de una peor adaptaci3n de los animales a las condiciones establecidas para la prueba. Se entiende que, en este caso, el hecho de adentrarse en la zona interna del aparato bajo luz blanca brillante supone para el animal superar su aversi3n natural hacia dichas condiciones, dadas las caracter1sticas de tigmotaxia y fotofobia que presenta la rata. Por ello, los menores valores presentados por los animales tratados para la deambulaci3n interna indican una peor adaptaci3n a la situaci3n adversa. De igual forma, los mayores tiempos de inmovilidad en estos animales representar1an una menor capacidad adaptativa y un mayor grado de emotividad o reactividad al estr1s por cuanto que suponen una inhibici3n o incapacidad de respuesta ante la prueba. Adem1as, podemos interpretar los menores valores de postura erguida como una respuesta menos adaptativa de los animales, dado que reducen una actividad que supone exploraci3n de un recinto nuevo. Hay que hacer notar aqu1 el diferente valor comportamental que tiene la tasa de postura erguida en el campo abierto frente al tablero de agujeros. El que el impulso explorador de la rata tenga que vencer el hecho de encontrarse en un recinto sin esquinas e iluminado con luz brillante hace que esta pauta en el campo abierto tenga un car1cter de superaci3n del estr1s y, por tanto, de menor emotividad (Brush y col. 1985; Gray 1971a, 1991; Viveros y Hern1ndez 1988). De ah1 que resulte consecuente que el tratamiento neonatal con naltrexona, que ha afectado a los par1metros relacionados con la emotividad en esta prueba, haya deprimido la tasa de postura erguida en el campo abierto, mientras

que no lo hizo en el tablero de agujeros donde, como ya comentamos, parece ser una pauta de actividad general.

La tasa de atusamiento rostral también fue sensible al tratamiento predeste con naltrexona. Sin embargo, en este caso los efectos parecen ser opuestos en los machos que en las hembras. En los machos tratados, el tratamiento produce un aumento de la tasa de atusamiento rostral. Este hallazgo está en consonancia con lo que venimos viendo hasta ahora, puesto que este parámetro está considerado en general como indicativo de reactividad al estrés, de mayor emotividad (Bardo y col. 1989; Drago y Genazzani 1991; Gray 1965, 1971a, 1991; Gray y col. 1965; Stone 1978; Viveros y Hernández 1988). Para algunos investigadores, esta pauta tiene un carácter de actividad de desviación, es decir respondería a una forma de liberar la tensión surgida ante una situación de estrés al no decidirse o saber cómo enfrentarse a ella (Albonetti y col. 1992; Drago y Genazzani 1991, Gray 1971a, 1991). En las hembras, sin embargo, se observó el fenómeno contrario: el tratamiento con naltrexona redujo los niveles de atusamiento rostral. Unos resultados parecidos han sido observado recientemente para esta pauta en el tablero de agujeros, en ratas sometidas a constreñimiento (Albonetti y Farabollini 1992). Es también interesante a este respecto, el hecho de que en las ratas salvajes (consideradas más reactivas ante la prueba de campo abierto) se haya encontrado que los machos presentan mayor atusamiento rostral y las hembras menor, comparados con las ratas de laboratorio (menos reactivas) macho y hembra, respectivamente (Price y Huck 1976). Podría argumentarse, en relación al carácter de indecisión o desviación del atusamiento rostral, que mientras en los machos

el tratamiento pudo causar un aumento de la emotividad que se manifestó, entre otras cosas, en que mostraran un aumento de la pauta de indecisión, en las hembras tratadas el conflicto se decantó hacia otros comportamientos positivamente indicativos de emotividad. En este sentido sería interesante recordar que el aumento del tiempo de inmovilidad en las hembras tratadas con naltrexona frente a sus controles (casi se sextuplica) es sensiblemente mayor que en los machos tratados (se cuadruplica). Por otra parte, es necesario señalar que en otros trabajos se ha encontrado descenso en la tasa de atusamiento rostral causado por estrés de choque eléctrico (Stone 1978, Gray 1991) lo que podría indicar que una bajada en esta pauta también podría ser una forma de respuesta emotiva para algunas situaciones. Además, en relación con nuestro tratamiento, se ha observado que la naloxona (antagonista opioide general) produce una reducción del atusamiento rostral en respuesta a un ambiente novedoso (Green y col. 1979). Estos hallazgos, junto a lo anteriormente expuesto, vendrían a indicar que ambas modificaciones del comportamiento de atusamiento rostral podrían ser indicativas de una reacción más emotiva, y que los resultados encontrados para esta pauta en los animales tratados neonatalmente con naltrexona puedan explicarse como una forma distinta de expresar en machos y hembras una mayor emotividad inducida por el tratamiento. Creemos que esta interpretación merece tenerse en cuenta a la vista de la naturaleza compleja que parece tener la pauta que venimos comentando y del resto de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas.

El aumento de la tasa de defecación durante la prueba de campo abierto producido por el tratamiento sólo fue significativo precisamente en las hembras, lo que parece estar

en concordancia también, en cierto modo, con lo que acabamos de discutir para interpretar los datos de la tasa de atusamiento rostral. El haber encontrado este efecto significativo del tratamiento sigue estando en la línea de que los efectos que causa implican una peor adaptación al estrés de la prueba, puesto que como se mencionó antes, la tasa de defecación se considera indicativa de la reactividad emocional del animal (Beatty 1979; Beatty y Fessler 1976; Blizard y col. 1975; Gray 1965, 1971ab, 1979ab, 1991; Gray y Lalljee 1974; Gray y col. 1965, 1969, 1975; Viveros y Hernández 1988). Es interesante señalar en comparación con el tablero de agujeros que, al igual que se encontró para la postura erguida, las condiciones de la prueba de campo abierto (que suponen una mayor intensidad de estrés) parecen conferir un mayor valor de emotividad a este parámetro haciéndole más sensible al tratamiento. En apoyo de esta idea de que el distinto carácter estresante hace posible el encontrar diferencias, está el hecho de que en la tasa de defecación en campo abierto sí aparecieron las diferencias sexuales esperables en este tipo de pruebas (los machos mayor tasa que las hembras) (Archer 1975; Beatty 1979; Beatty y Fessler 1976; Blizard y col. 1975; Broadhurst 1957; Gray 1965, 1971ab, 1979ab, 1991; Gray y col. 1965, 1969, 1975) y que se han confirmado también en nuestro laboratorio (Hernández 1981, Tesis Doctoral; González 1991; González y Leret 1992; Sañudo 1990, Tesis de Licenciatura; Viveros y Hernández 1988). Como se recordará no se hallaron estas diferencias en el tablero de agujeros.

Continuando con la discusión de los resultados en campo abierto, también aquí las hembras mostraron mayor actividad que los machos. En este sentido los resultados fueron

similares a los de tablero de agujeros: mayores deambulaciones externa e interna así como mayor número de posturas erguidas que los machos. Estos datos coinciden con lo encontrado por otros autores para esta prueba (Beatty 1979; Beatty y Fessler 1976; Blizard y col. 1975; Brand y Slob 1988; Broadhurst 1957; González y Leret 1992; Gray 1965, 1971ab, 1979ab, 1991; Gray y col. 1965; Price y Huck 1976; Slob y col. 1981, 1986; Studelska y Beatty 1978; Stewart y col. 1975; Valle y Bols 1976; Viveros y Hernández 1988). Cabría señalar, sin embargo, que la diferencia sexual para la deambulación interna fue más clara en el campo abierto, puesto que, como se explicó en los resultados, aquí el análisis post hoc sí reveló diferencias (entre machos y hembras controles). Es posible que esto pueda ir también en la línea anteriormente propuesta de que el mayor carácter estresante de la prueba ayude a que se signifiquen las diferencias. Aquí se añadiría al componente meramente explorador un factor de emotividad, ambos sujetos a diferencias sexuales (Archer 1975; Beatty 1979; Beatty y Fessler 1976; Blizard y col. 1975; Broadhurst 1957; Gray 1965, 1971ab, 1979ab, 1991; Gray y Lalljee 1974; Gray y col. 1965; Meyerson y col. 1988; Studelska y Beatty 1978; Valle y Bols 1976; Viveros y Hernández 1988; Wilson y col. 1991). Convendría precisar, que el fuerte efecto del tratamiento con naltrexona sobre la tasa de postura erguida hace que se enmascare la diferencia sexual entre los animales tratados. Hay que indicar por último, que, a diferencia de lo indicado en algunos trabajos (Gray 1971a, 1991; Gray y col. 1965), no se observaron diferencias sexuales significativas entre los controles para el atusamiento rostral y la tendencia parece ser opuesta a la reflejada en los mencionados trabajos (menor número en machos que en hembras en nuestro estudio). La razón de este resultado no está muy clara,

pero podría deberse a que nuestros animales presentaron unas tasas bastante bajas de este parámetro lo que unido a la dispersión de los datos dificulta en algunos casos poder llegar a resultados concluyentes. De todos modos, hay que señalar que en nuestro laboratorio se encontraron resultados muy similares en trabajos anteriores (Viveros y Hernández 1988; Sañudo, datos no publicados) y que otros autores tampoco han encontrado diferencias sexuales para esta pauta en el campo abierto (Segarra y McEwen 1992; Valle y Bols 1976), pero sí han observado una tendencia similar a la de nuestro trabajo (Price y Huck 1976; Moore 1986ab). Incluso han aparecido diferencias significativas en sentido opuesto al de los primeros trabajos, en el tablero de agujeros (Albonetti y Farabollini 1992). Es más no parece que aquellos autores hayan conseguido replicar siempre aquellas primeras observaciones (Gray y Lalljee 1974; Gray y col. 1965). Todo ello viene a incidir en la compleja significación que parece tener el comportamiento de atusamiento rostral o *grooming*, cuestión ya comentada anteriormente.

No parece que la exposición repetida a la prueba tenga efecto significativo sobre las tasas de defecación y atusamiento rostral que mostraron los distintos grupos de animales en cada una de las tres sesiones. Pudiera deducirse que son parámetros de emotividad muy primarios que se manifiestan con la misma intensidad siempre que una situación se presenta con idénticas condiciones, sin que se produzca habituación. También es posible que un período de tres días sea demasiado corto para que la habituación tenga lugar en estas pautas comportamentales. Otro factor que debe tenerse en cuenta es los pequeños valores que toman estas tasas, lo que dificulta que se encuentren diferencias

estadísticamente significativas, dado que hay menos margen para la variación. En cualquier caso, los datos encontrados en nuestro estudio están en la misma línea que los observados en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio en que tampoco se vieron cambios muy acusados en estos parámetros a lo largo de los tres días de prueba (Sañudo 1990, Tesis de Licenciatura). Coinciden, además, con los resultados de estudios llevados a cabo en otros laboratorios, en que tampoco se encontraron diferencias con la repetición de la prueba, para estas variables (Beck y Chow 1984; Blizard y Deneff 1973; Gray y col. 1969, 1975; Valle y Bols 1976).

Con las excepciones de estas dos variables, las pautas observadas en el campo abierto sufrieron variaciones durante las tres sesiones. La tendencia general es de descenso de actividad, con disminución de las deambulaciones externa e interna y de la tasa de postura erguida y consecuente aumento del tiempo de inmovilidad. Este fenómeno ya ha sido observado en trabajos anteriores en nuestro laboratorio (Sañudo 1990, Tesis de Licenciatura) y por otros autores (Beck y Chow 1984; Gray y col. 1965; Studelska y Beatty 1978; Valle y Bols 1976) y puede ser debido a un progresivo desinterés de los animales en explorar un ambiente que ya conocen. Además, y particularmente en lo que se refiere a la deambulación externa, debe tenerse en cuenta que el primer día de prueba puede aparecer hiperactividad debida a una reacción de escape que deja de manifestarse como tal en las sesiones siguientes. Por último, no debe excluirse algún componente de reacción de desesperación al enfrentarse los animales a un ambiente adverso del que han aprendido que no pueden escapar y que se traduciría en un aumento de la inmovilidad. En

relación con esto, otros autores han observado que este descenso de actividad apenas se produce si los animales se someten a la prueba de campo abierto junto con otro individuo (Beck y Chow 1984). Este hallazgo podría sugerir que la disminución de la actividad es menos pronunciada cuando se introduce un factor que tiende a mitigar el grado de estrés que experimenta el animal.

Las hembras controles, que en general son menos emotivas y más activas, mostraron unos descensos menores de las pautas de deambulación interna y postura erguida, en comparación con los machos controles y ninguna variación significativa de la deambulación externa ni del tiempo de inmovilidad (mientras que en los machos controles sí las hubo). Este resultado es similar a los obtenidos en anteriores estudios, en que se observó un menor descenso de la actividad en las hembras que en los machos a lo largo de los tres días de prueba (Gray y col. 1975; Sañudo 1990, Tesis de Licenciatura; Valle y Bols 1976). Por otra parte, los animales tratados con naltrexona presentaron las mayores reducciones en la deambulación externa y el mayor aumento en el tiempo de inmovilidad a lo largo de los tres días de prueba, lo cual les sitúa en el extremo opuesto de las hembras controles. Hay que hacer notar que, de forma similar a nosotros, otros autores han encontrado que los descensos en la deambulación general en campo abierto sólo eran evidentes en sus animales tratados con una toxina anticatcolaminérgica (6-OHDA) tras una mayor exposición a la prueba (Fukuda y col. 1977) y ya apuntan la posibilidad de que ello suponga una distinta situación psicológica. De acuerdo con las posibles interpretaciones arriba expuestas, este comportamiento de los animales tratados



neonatalmente con el antagonista opioide podría ser indicativo de una mayor emotividad y/o un menor impulso explorador respecto a los controles, lo que resultaría coherente con lo encontrado en las otras dos pruebas comportamentales realizadas en este trabajo. Conviene señalar aquí que, en concordancia con esta interpretación, otros autores han encontrado que los animales manipulados neonatalmente [considerados menos emotivos por algunos autores (Ader y col. 1960; Ardila y col. 1977; Denenberg 1964; Denenberg y Zarrow 1971; File 1978b; Gray 1971ab, 1991; Levine 1962; Levine y col. 1956, 1967; Meaney y col. 1985)] presentan menores descensos de la actividad en campo abierto al repetir la prueba tres días (Valle y Bols 1976). En esta misma línea, se observó en otro estudio (Gray y col. 1965) que los animales de la cepa reactiva al estrés experimentan una tendencia a bajar la deambulación mayor que los de las otras cepas.

El hecho de no verse un descenso significativo en la tasa de postura erguida en los animales tratados con naltrexona es posible que se deba a que esta pauta presentaba ya unos valores muy pequeños el primer día de prueba. Es interesante señalar además, que el efecto del tratamiento con naltrexona sobre la deambulación externa sólo se hace evidente los días segundo y tercero de prueba, probablemente, como consecuencia de los aumentos más marcados del tiempo de inmovilidad que muestran los animales tratados con la repetición de la prueba. De hecho, las pautas en las que los animales tratados, tanto machos como hembras, se mostraron más sensibles a la repetición de la prueba fueron precisamente la deambulación externa y el tiempo de inmovilidad.

La distinta evolución de los machos y hembras controles en cuanto a la deambulación externa y al tiempo de inmovilidad, a lo largo de los tres días de prueba, explica también las diferencias sexuales que aparecen en este último parámetro y que sólo se manifiestan el día tercero de prueba, en que los machos mostraron valores significativamente mayores que las hembras. En general, para la prueba de campo abierto que venimos comentando, puede decirse que las pautas más sensibles a diferencias sexuales entre los animales controles fueron las deambulaciones externa e interna y las tasas de postura erguida y defecación. El tratamiento con naltrexona, por su parte, hizo desaparecer las diferencias sexuales en deambulación interna, postura erguida y la que aparece el tercer día en el tiempo de inmovilidad. Sin embargo, hizo que aparecieran en la tasa de atusamiento rostral. La interferencia del tratamiento con naltrexona en las diferencias sexuales en cuanto a la deambulación interna y postura erguida puede deberse a que el efecto depresor del tratamiento sobre la actividad se dejó sentir de forma más acusada en las hembras que eran precisamente las más activas de los dos grupos controles. La interacción significativa tratamiento x sexo que aparece en el tiempo de inmovilidad explica, a su vez, la desaparición de las diferencias sexuales entre los animales tratados el día tercero de prueba. Así, mientras que tanto machos como hembras tratados con naltrexona muestran valores altos y similares para este parámetro, entre los controles sólo los machos vieron aumentados sus tiempos de inmovilidad, aunque siempre por debajo de los animales tratados. De nuevo la interacción significativa sexo x tratamiento explica la aparición de diferencias sexuales entre los animales tratados en cuanto al atusamiento rostral. De hecho, el tratamiento con naltrexona parece afectar de forma opuesta a ambos

sexos: tiende a aumentarlo en los machos y a disminuirlo en las hembras, como ya se discutió anteriormente.

En relación con un estudio anterior (Valle y Bols 1976), cabe poner de manifiesto que los resultados de nuestros animales controles -que presentan menores descensos con la reexposición a la prueba- son bastante similares a los que dichos autores encuentran en sus animales manipulados en el periodo juvenil, y muestran descensos menores que sus controles no manipulados. Además, ellos también encontraron un menor efecto de la repetición en las hembras, particularmente en las manipuladas, en las que, a su vez, encontraron resultados similares a los de nuestras hembras controles. Esto parece sugerir una posible influencia del procedimiento neonatal empleado sobre el comportamiento de los animales adultos y que favorecería su adaptación a la prueba. En este sentido, conviene recordar que no apareció en nuestro trabajo la pauta de congelamiento o *freezing* (inmovilidad total, incluido el movimiento de vibrisas). Sin embargo, y como ya hemos visto, este menor grado de estrés que parecen mostrar nuestros animales no impide que se observen con toda contundencia y claridad los efectos del tratamiento neonatal con naltrexona.

Como ya mencionamos en el apartado de técnicas experimentales, se considera que exponer a las ratas al laberinto en cruz les produce un conflicto de aproximación/evitación (Pellow y col. 1985). Se ha interpretado que, ante un laberinto de este tipo la menor tendencia natural que presentan los animales a explorar un brazo elevado y abierto se debe

a que el temor evocado por esta situación es mayor que el impulso exploratorio (Montgomery 1958; Pellow y col. 1985). Se ha demostrado además que esta aversión a los brazos abiertos está motivada por *miedo* o ansiedad, tanto por evidencias comportamentales como fisiológicas (Pellow y col. 1985). Es posible que la ansiedad no se produzca hasta que el animal entra en el brazo abierto, dado que se ha encontrado que los animales no presentan una tendencia significativa a entrar primero en un brazo cerrado (Pellow y col. 1985). Sería interesante señalar que aquí también se observó, aunque no se registró por no ser objeto de nuestro estudio, que a pesar de que todos los individuos eran enfrentados a un brazo cerrado al comienzo de la prueba, algunos de nuestros animales (con independencia del grupo experimental) se volvían y penetraban en uno abierto en primer lugar. El número de entradas total en uno u otro tipo de brazos se considera un parámetro de actividad general (Graeff y col. 1990; Johnston y File, 1991; Pellow y col. 1985; Wilson y col. 1991).

Los resultados obtenidos para esta prueba de laberinto en cruz indican de forma muy concluyente que el tratamiento predestete con naltrexona ha incrementado los niveles de ansiedad en los animales tratados al explorar en este aparato. Ello se ha manifestado como un descenso en el número de veces y tiempo que exploraron los brazos abiertos y un aumento del tiempo en los brazos cerrados, lo que, de acuerdo con lo referido anteriormente es indicativo de mayor temor/ansiedad. Esta impresión primera queda corroborada con los resultados de las otras variables analizadas. Así, la representatividad del menor número de entradas en los brazos abiertos de los animales tratados se pone de

manifiesto en la menor razón de entradas en brazos abiertos frente al número total de entradas encontrada para estos grupos. De igual forma se comprueba lo indicativo de las diferencias encontradas para los tiempos de exploración cuando se atiende a los descensos significativos del porcentaje de tiempo en los brazos abiertos y al aumento del tanto por ciento en los cerrados que se observa en los animales tratados con naltrexona. Además, el hecho de que no aparezcan en estos mismos animales descensos significativos para el número de entradas y tiempo de exploración totales ni para el número de entradas en los brazos cerrados, permite afirmar que el efecto de la naltrexona sobre los parámetros relacionados con la ansiedad es específico y no se debe a que el tratamiento haya producido un descenso general de la actividad de los animales.

Por lo que se refiere a las diferencias sexuales, éstas no han parecido ser relevantes en esta prueba y, a diferencia de lo encontrado en otros estudios (Albonetti y Farabollini 1992; Johnston y File 1991; Wilson y col. 1991) sólo fué significativo el que las hembras presentaran mayor número de entradas en brazos cerrados, y como consecuencia de ello - ya que no difirieron de los machos en cuanto a entradas en los abiertos- en el número de entradas totales. Con todo, estos resultados son coherentes con una mayor actividad de las hembras, que sí concuerda con lo observado en este tipo de estudios. Cabe señalar, sin embargo, que no se siempre se han comprobado estas diferencias sexuales entre los animales controles (Steenbergen y col. 1991).

En trabajos anteriores se ha encontrado que los animales entran más en los brazos

cerrados que en los abiertos y permanecen además más tiempo explorando los primeros (Pellow y col. 1985; Steenbergen y col. 1991; Wilson y col. 1991). Éstos han sido claramente los resultados en nuestros animales tratados con naltrexona. Sin embargo, los animales controles no mostraron una tendencia significativa a entrar más en los brazos cerrados, aunque sí permanecieron más tiempo en ellos. Es interesante señalar a este respecto, que nuestros animales controles parecen presentar un número mayor de entradas totales y especialmente en brazos abiertos que los encontrados en otros estudios (Farabollini y col. 1988; Johnston y File 1991; Pellow y col. 1985; Steenbergen y col. 1991; Wilson y col. 1991). El que nuestros animales presentasen un menor nivel de temor/ansiedad que el indicado en otros estudios podría deberse a posibles diferencias de cepa (Pellow y col. 1985), al tipo de manipulación neonatal y posterior (ver sección IV.4) al que fueron sometidos y/o a nuestro protocolo de trabajo que deja tres días de recuperación a los animales entre pruebas. En cualquier caso, a la vista de los resultados con nuestros animales tratados, la prueba sigue pareciendo muy válida para el análisis de tratamientos de tipo ansiogénico.

En términos generales, los animales controles en este trabajo han presentado mayor actividad exploratoria y menores ansiedad y emotividad o reactividad al estrés que en estudios precedentes. Ello, como ya se ha comentado, puede ser debido al hecho de que los animales fuesen inyectados diariamente durante todo el periodo predestete, una manipulación neonatal que puede haber favorecido su capacidad adaptativa en la edad adulta. Estos efectos posibles de la manipulación neonatal ya han sido estudiados por otros

autores utilizando diversos procedimientos (Ader y col. 1960; Ardila y col. 1977; Cross y Labarba 1978; Denenberg 1964; Denenberg y Zarrow 1971; File 1978b; Gray 1971ab, 1991; Hernández 1981, Tesis Doctoral; Levine 1962; Levine y col. 1956, 1967; McCarty y col. 1981; Meaney y col. 1985; Vázquez y Akil 1992; Villescas y col. 1977), como ya indicamos anteriormente. En nuestro caso, la mejor adaptación parece haberse dado para el laberinto en cruz, en concreto para la exploración de brazos abiertos, indicativo de una menor ansiedad. Este fenómeno, podría ser, además, responsable en cierta medida de la ausencia de diferencias sexuales encontradas para este parámetro en el presente trabajo. Es de señalar a este respecto, que para el resto de las medidas comportamentales sí se han replicado las diferencias sexuales descritas en la literatura, incluso se ha sugerido su existencia para la variable introducida de deambulación interna en el tablero de agujeros.

En el protocolo comportamental empleado, a diferencia de otros autores (Johnston y File 1991; Kshama y col. 1990; Pellow y col. 1985; Steenbergen y col. 1991; Wilson y col. 1991), hemos dejado al menos tres días de intervalo entre pruebas. Con ello hemos pretendido asegurarnos de que los resultados de una prueba no se vieran afectados por haber realizado la precedente, así como evitar un efecto de estrés acumulado para la última de ellas. Además, desde un punto de vista más práctico, el hecho de realizar la prueba de campo abierto con repetición ya imponía la condición de trabajar en días distintos. En este mismo sentido, al pretender probar machos y hembras, tratados y controles, y no dejar animales probados y sin probar en la misma jaula, para evitar interferencias en los resultados (ver Gray 1969, 1971a, 1991), era muy difícil realizar más de una prueba por

camada dentro de la misma fase del ciclo diario. En cualquier caso, la riqueza de los resultados obtenidos parece asegurar la validez del método empleado para valorar los efectos comportamentales de un tratamiento farmacológico. La necesidad de baterías comportales de este tipo se ha sugerido recientemente (Johnston y File 1991).

La batería comportamental empleada en este trabajo consiste en tres pruebas que apenas han sido utilizadas conjuntamente con anterioridad, y en el único informe encontrado en la literatura no se estudia la repetición de la prueba de campo abierto y está enfocado al análisis de diferencias sexuales (Farabollini y col. 1987). El amplio número de variables medidas en cada prueba, junto con el mencionado estudio del efecto de la repetición del campo abierto nos ha permitido, además de replicar muchos de los resultados obtenidos en trabajos anteriores, añadir nuevos datos que pueden contribuir a una mejor caracterización de las diferentes pruebas utilizadas. Así, los distintos resultados obtenidos para las tasas de postura erguida y de defecación en el tablero de agujeros y en el campo abierto nos permite afirmar el componente fundamentalmente emotivo de estas pautas en esta última prueba. Además, nuestros resultados indican que la prueba de campo abierto parece más sensible a las diferencias sexuales que la del laberinto en cruz, lo que podría indicar que la emotividad sería más sensible a dichas diferencias que la ansiedad.

Conviene señalar, que este trabajo es quizá uno de los pocos en los que un tratamiento farmacológico presenta unos resultados tan concordantes para las diferentes pruebas comportamentales (ver p.ej. Albonetti y Farabollini 1992; Kshama y col. 1990;



Pellow y col. 1985). Además, es llamativo cómo el tratamiento neonatal con naltrexona parece afectar específicamente a los parámetros relacionados con la adaptación a las condiciones de la prueba, sin alterar significativamente aquellas pautas más claramente locomotoras o de actividad general. En relación con esto, es notable la diferencia que permite establecer el tratamiento entre la postura erguida en campo abierto y tablero de agujeros, al afectar a la primera y no a la segunda, como ya se ha comentado anteriormente. Finalmente, es interesante el hallazgo de otros autores de que la naloxona administrada de forma aguda a ratas de 31-33 días reduce las pautas de juego, pero no la actividad general (Siegel y Jensen, 1986), lo que, junto con nuestros resultados podría apoyar la idea de que los antagonistas opiodes generales no parecen tener un efecto sobre la locomoción general en ratas neonatales.

Por otra parte, los resultados obtenidos con el tratamiento con naltrexona son de particular interés en lo que se refiere a la implicación del sistema opioide endógeno en la regulación del comportamiento. Existe un gran número de estudios que sugieren que la liberación de péptidos opioides podría formar parte de la reacción adaptativa a distintas formas de situaciones estresantes (Fanselow y Bolles 1979; Fontani y col. 1993; Katoh y col. 1990; Sunal 1986). Esta visión se ve reforzada por el hecho de que la administración de los agonistas opiáceos parece tener efectos equiparables (Morris y Gebhart 1978). Junto con esto también se ha propuesto para los opioides un papel facilitador de la exploración en ambientes novedosos o adversos (para revisión ver van Abeelen 1989). Coherentemente con este postulado, se ha observado que la administración de agonistas opioides incrementa

la exploración en ambientes novedosos, mientras que los antagonistas como la naloxona o la naltrexona reducen los pautas asociadas a la exploración (para revisión ver Bardo y col. 1989). Además, en el ser humano son conocidos los efectos ansiolíticos y antidepresivos de las sustancias opiáceas, mientras que la naltrexona puede tener el efecto opuesto (Emrich y Schmauss 1991; Hollister y col. 1981). También se ha relacionado a los opioides con la modulación de las pautas locomotoras. Así, se sabe que la administración de morfina produce hiperactividad (Hoskins y col. 1986). Sin embargo, trabajos más recientes utilizando agonistas selectivos e inyectando en zonas encefálicas discretas han puesto de manifiesto que las acciones de los opioides sobre las pautas locomotoras y relacionadas con la ansiedad dependen del tipo de receptor activado y la región encefálica donde se aplique (Calenco-Choukroun y col. 1991; Mickley y col 1990; Morelli y col. 1989). Estos últimos estudios ponen de manifiesto la complejidad de los efectos de los distintos agonistas exógenos. Sin embargo, parece clara la importante implicación del sistema opioide en este tipo de comportamientos, aunque no sea fácil atribuir una función concreta a cada uno de sus componentes.

En la mayoría de los trabajos que aparecen en la literatura en los que se emplean agonistas o antagonistas opioides durante el periodo postnatal temprano, se han estudiado principalmente cuestiones relacionadas con el desarrollo somático y neurobiológico o con la nocicepción (para revisión ver Zadina y col. 1985). Por contra, son menos los trabajos en los que se han investigado los efectos de dichos tratamientos durante el periodo perinatal sobre otros comportamientos susceptibles de ser afectados por los opioides en la

edad adulta. A este respecto, se ha descrito que el tratamiento con  $\beta$ -endorfina tanto pre- como postnatal no produce cambios en la actividad en campo abierto cuadrado (Zadina y col. 1985). En cuanto a otros trabajos más directamente comparables con nuestro trabajo, son escasos los datos disponibles respecto a los efectos de los tratamientos neonatales con naltrexona y los resultados obtenidos hasta ahora se refieren a aspectos muy parciales del comportamiento. En uno de estos estudios, cuando se inyectó naltrexona en dosis constante (100  $\mu$ g/inyección) durante los días 1 al 10, se observó un incremento del comportamiento exploratorio espontáneo (olfateo e investigación) y de la postura erguida en las hembras y una reducción de la postura erguida en los machos (Meyerson y col. 1988). Se ha informado, además, de que la administración de naltrexona en la bebida de la madre gestante y/o lactante parece favorecer la extinción de la respuesta emocional condicionada de los animales en la edad adulta. También se encontró un descenso de la actividad espontánea a lo largo de los días en las animales tratados, aunque los autores en este caso lo interpretaron como una mejora en la habituación frente a los controles. Para ambos parámetros los efectos fueron más marcados en hembras que en machos (Harry y Rosecrans 1979). En los trabajos que acabamos de comentar se miden variables en general distintas y se emplean pruebas y condiciones diferentes, por lo que las comparaciones con nuestro trabajo no son fáciles de hacer en un sentido riguroso. En cualquier caso, las posibles diferencias frente a nuestro estudio en cuanto a los efectos inducidos por el tratamiento de naltrexona sobre la emotividad podrían explicarse también por la diferente vía de administración (en el trabajo Harry y Rosecrans 1979), o la dosis empleada (trabajo de Meyerson y col. 1988). En ambos casos, además, el período del desarrollo durante el

que se trató a los animales es distinto del empleado en nuestro estudio. La posibilidad de obtener distintos resultados comportamentales por este último motivo es señalada incluso por los propios autores en uno de los casos (Meyerson y col. 1988). Por otra parte, es interesante señalar que en un trabajo en el que se administró Met-enkefalina (péptido agonista opioide endógeno) a las ratas en el periodo neonatal, se encontró una facilitación del comportamiento en un laberinto complejo cuando llegan a adultos (Kastin y col. 1980), y en otro en el que se expuso neonatalmente a las crías a metadona, éstas incrementaron su actividad frente a los controles en diversas pruebas (campo abierto, jaula de actividad, rueda de actividad, plataforma elevada) en la edad adulta (Zagon y col. 1979). Estos resultados suponen un apoyo indirecto a nuestros resultados, puesto que utilizando un agonista estos autores observaron un efecto opuesto (mejoran su adaptación) al encontrado por nosotros con un antagonista opioide como la naltrexona.

Resulta interesante, asimismo, comprobar que, según nuestro protocolo, la administración durante el período predestete de naltrexona produzca de forma permanente en la edad adulta efectos comportamentales similares a los producidos por los antagonistas opioides (o bien opuestos en cierta medida a algunos de los producidos por los agonistas) cuando se emplean en animales adultos, aunque quizá incluso más específicos del comportamiento adaptativo. Por otro lado estos resultados sugieren que los opioides endógenos durante el período neonatal desempeñan un papel importante en el establecimiento de los patrones de comportamiento adaptativo ante situaciones ambientales novedosas o adversas en el adulto. Más aún, parecen indicar que la distorsión de este

sistema durante las etapas tempranas del desarrollo posnatal podría provocar una inadecuación de los individuos ante situaciones de este tipo.

Como hemos venido indicando a lo largo de este trabajo, parecen existir períodos críticos para el desarrollo del sistema opioide endógeno. Nuestros resultados comportamentales apoyan este punto de vista, e indican que durante el período predestete la disfunción del sistema opioide, en pleno proceso de maduración podría tener importantes repercusiones en el adulto. Este planteamiento resulta además de un particular interés desde el punto de vista clínico. Concretamente en cuestiones tales como los tratamientos que utilizan naltrexona para combatir la apnea infantil (Myer y col. 1990; Szeto y Cheng 1992) o los programas de desintoxicación - en los que se están empezando a utilizar antagonistas opioides- por lo que se refiere a su aplicación a madres gestantes o lactantes (Harry y Rosecrans 1979). Por otro lado, nuestros resultados sugieren que determinadas situaciones psicológicas que se produjeran durante el período neonatal y supusieran el bloqueo funcional del sistema opioide, podrían llegar a producir desarreglos adaptativos similares a los encontrados por nosotros en este trabajo. En este sentido es interesante mencionar aquí que se ha descrito que el someter a las ratas a la situación de la prueba de campo abierto podría interferir la liberación de opioides (se sugiere la  $\beta$ -endorfina) en determinadas circunstancias (Izquierdo y col. 1989). Ello podría apoyar la mencionada posibilidad de que factores de estrés ambiental que afectaran al sistema opioide durante el período estudiado pudieran producir efectos similares a los de nuestro tratamiento.

#### IV.4 SEGUIMIENTO DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL DESARROLLO NEUROBIOLÓGICO Y SOMÁTICO: TRATAMIENTO CON NALTREXONA

[Los niveles de significación que se especifican entre paréntesis en las siguientes secciones corresponden a los resultados del análisis de varianza. Para el análisis *post-hoc* de Duncan el nivel de significación se fijó en  $p < 0.05$ ) (ver sección III.6.4 sobre *Análisis estadístico*)]

##### IV.4.1 ADN, PROTEÍNAS Y PESO DEL CEREBELO; NÚMERO DE NÚCLEOS Y RAZÓN CONTENIDO DE PROTEÍNAS POR NÚCLEO

El tratamiento con naltrexona tuvo efecto sobre el peso del cerebelo a los 7 días de edad ( $p < 0.0001$ ). Dicho efecto supuso un incremento significativo del peso cerebelar tanto en machos (16% de aumento) como en hembras (12%) (Tabla 25, Fig. 33a). No se encontraron efectos significativos del tratamiento para este parámetro en ninguna de las otras edades estudiadas (Tabla 25). Las diferencias sexuales sólo fueron significativas en la edad adulta, y lo fueron tanto en los animales tratados como en los controles. Esta diferencia fue en favor de los machos, para los que se obtuvo un mayor peso del cerebelo (un 8% más que las hembras). Además, este parámetro aumentó durante el desarrollo ( $p < 0.0001$ ) siendo significativo el incremento para cada edad estudiada hasta la edad adulta en todos los grupos. Estos incrementos fueron siempre elevados (del 190% en controles y 155% en tratados entre 7 y 14 días; de un 34% entre 14 y 22 días de edad; y de casi el

50% en machos y cerca del 40% en hembras desde el día 22 a la edad adulta).

Por lo que se refiere a la concentración de ADN, también se encontraron diferencias significativas al día 7 ( $p < 0,0001$ ) en favor de los animales tratados frente a los controles, tanto en machos (incremento del 15%) como en hembras (25%) (Tabla 25, Fig. 33b). Este efecto no alcanza significación estadística a los 14 días de edad ( $p = 0,1$ ), aunque se apunta un efecto de interacción tratamiento x sexo ( $p = 0,1$ : incremento del 7% en machos tratados, que no hay en las hembras tratadas), y desaparece al día 22 (Tabla 26). El análisis de varianza reveló un efecto significativo del tratamiento en la edad adulta ( $p < 0,05$ ) en sentido contrario al encontrado a los 7 días (descenso de un 4% en machos y de un 6% para las hembras) (Tabla 26). El análisis *post-hoc* dió como significativas las diferencias entre los grupos con los valores más extremos, lo que podría interpretarse como un efecto general del tratamiento que solamente manifiesta significación estadística clara cuando se agrupan machos y hembras. No aparecieron diferencias sexuales a ninguna de las edades estudiadas. La concentración de ADN varió significativamente a lo largo de estas edades en todos los grupos experimentales ( $p < 0,0001$ ). Puede decirse que, en conjunto, la concentración de ADN aumentó del día 7 al día 14, a partir del cual se produce un descenso hasta la edad adulta. Esta bajada en la concentración puede ser debida a que ésta se expresa por mg tejido, y que esta región del encéfalo se encuentra en crecimiento, según puede deducirse de los datos del peso cerebelar (ver Tabla 25). Así, el aparente descenso de este parámetro sería debido a un aumento de otras sustancias y no a una bajada real de los niveles de ADN. El análisis de Duncan reveló que las diferencias fueron significativas entre todas las

edades estudiadas para el caso de los machos controles. También lo fueron en los otros grupos con una excepción en cada caso: entre 7 y 22 días en los machos y hembras tratados, y entre 7 días y la edad adulta en las hembras controles.

En la misma línea que lo visto anteriormente, el contenido de proteínas totales también se vio afectado por el tratamiento neonatal con naltrexona a los 7 días de edad ( $p < 0,05$ ). Asimismo, los animales tratados presentaron niveles más elevados que los controles (un 12% los machos y un 21% las hembras) (Tabla 27, Fig. 33c). Esta diferencia sólo alcanzó significación entre los grupos de hembras. Sin embargo, la tendencia es claramente la misma en ambos sexos, y, dado que la interacción tratamiento x sexo no fue significativa, no cabría hablar de un distinto efecto en machos y hembras a esta edad. En cambio, si sería éste el caso a los 14 días de edad, en el que los machos tratados mostraron valores mayores que los controles (un 5% de elevación) mientras que para las hembras tratadas con naltrexona se encontraron niveles menores (un 9% de descenso) (Tabla 27). La interacción tratamiento x sexo sí fue significativa ( $p < 0,05$ ), y el análisis de Duncan sólo encontró significación para la diferencia entre las hembras. Esto estaría correlacionado con el interacción que se apuntaba a esta misma edad en el contenido de ADN. Este efecto pierde significación estadística a los 22 días de edad (tratamiento x sexo:  $p = 0,06$ ) y está ausente en la edad adulta. La única diferencia sexual encontrada fue a los 14 días entre machos y hembras tratados, debida a la mencionada interacción tratamiento x sexo. La concentración de proteínas totales en el cerebelo se incrementó progresivamente con la edad hasta la edad adulta ( $p < 0,001$ ). Todos los aumentos entre las distintas edades fueron



significativos para los machos y hembras tratados, y, con la excepción de entre los 14 y 22 días, para los controles de ambos sexos.

Los animales de ambos sexos tratados con naltrexona, consecuentemente con lo encontrado para la concentración de ADN, mostraron un mayor número de núcleos que sus controles respectivos a los 7 días de edad ( $p < 0,0001$ ; un 38% los machos y 26% las hembras) (Tabla 28, Fig. 34a). También este efecto perdió la significación estadística a los 14 días de edad (tratamiento:  $p < 0,06$ ; interacción tratamiento x sexo:  $p = 0,1$ ), y no existe a los 22 días (Tabla 28). Aunque no alcanzó significación estadística ( $p = 0,1$ ), apareció una tendencia en sentido contrario en los adultos (un descenso del 4% en los machos tratados y del 5% en las hembras tratadas) (Tabla 28). Esto podría ser un correlato del descenso encontrado en ADN a esta edad para los animales tratados (ver Tabla 26). No aparecieron diferencias sexuales en ninguna de las edades estudiadas. La edad también tuvo un efecto significativo sobre este parámetro ( $p < 0,0001$ ). En los animales controles, tanto machos como hembras, se produjeron aumentos significativos en el número de núcleos con la edad hasta el día 22, que ya no difirió de los valores del adulto. Para los animales de ambos sexos tratados con naltrexona sólo se produjo un aumento significativo entre los días 7 y 14, sin variaciones significativas entre los 14 días y la edad adulta.

Por lo que se refiere a la razón proteínas totales/núcleo no se encontraron diferencias significativas debidas al tratamiento ni a los 7 ni a los 14 días de edad, posiblemente debido a una compensación de los efectos encontrados en los dos parámetros

por separado (Tabla 29, Fig. 34b). A los 22 días de edad el análisis de varianza reveló una interacción del tratamiento con el sexo ( $p < 0,01$ ), lo que estaría en línea con la tendencia encontrada para la concentración de proteínas totales (ver Tabla 27). Los machos tratados presentaron un valor de este cociente mayor que los controles (un 17% de incremento), mientras que la hembras tratadas lo presentaron menor (un descenso del 4%) (Tabla 29). El análisis de Duncan sólo encontró significación para la diferencia entre machos. Además, los machos controles presentaron valores significativamente más bajos que las hembras controles a esta edad. También se encontraron diferencias sexuales en la edad adulta ( $p < 0,05$ ), pero fueron en sentido contrario al encontrado a los 22 días: los machos mostraron tasas de proteínas/núcleo más elevadas que las hembras (un 3% los controles y un 4% los tratados). Las comparaciones post-hoc solamente dieron como significativa la diferencia entre los controles. Al no existir interacción entre los factores, y observarse la misma tendencia en tratados y controles, hay que pensar que se trata de un efecto general, con independencia del tratamiento. Esta variable también se vio modificada durante el desarrollo postnatal ( $p < 0,0001$ ). En los machos controles se produjo un incremento significativo entre los días 7 y 22, también fue significativo el incremento entre los 22 días y la edad adulta. Todos los incrementos entre las edades fueron significativos en los machos tratados. También lo fueron para las hembras tratadas y controles, exceptuando la comparación entre los valores a 7 y 14 días.

#### IV.4.2 APERTURA OCULAR BILATERAL

Se pudo observar que en un período de 5 días (días 11 al 15) el porcentaje de aparición de la apertura ocular bilateral pasa del 0% al 100% (Fig. 35). A los 11 días de edad este parámetro se encuentra en torno al 10%, al día 12 alcanza el 50%, aproximadamente, y llega hacia el 90% en el día 14. A los 15 días de edad todos los animales tenían abiertos los dos ojos. Las variaciones en el porcentaje de adquisición entre las diferentes camadas fueron elevadas. No se encontraron efectos significativos para esta variable.

#### IV.4.3 CONSUMO ALIMENTARIO Y DE BEBIDA

Durante el período tras finalizar el tratamiento (días 23 al 32) que hemos denominado aquí *postdestete*, se encontraron, tanto para el consumo de pienso como de agua, efectos significativos del tratamiento con naltrexona ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  respectivamente), sexo ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,05$ ) y la edad ( $p < 0,0001$  para ambos parámetros). No fueron significativas las interacciones entre los factores. El consumo alimentario y de bebida fue mayor en los animales tratados que en los controles (una diferencia media de 1g y 2ml, respectivamente) en ambos sexos (Fig. 36ab). Por lo que se refiere a las diferencias sexuales, los machos presentaron mayores valores para ambas variables frente a las hembras (diferencias medias: 1g y 0,7 ml) tanto en los grupos tratados como en los controles. Además, los consumos de comida y bebida aumentaron con la edad en todos los

grupos experimentales (un incremento medio de 1g y 1ml diarios, respectivamente).

Durante el período peripuberal (Fig. 37ab) también fueron significativos para el consumo de alimentario y de bebida los factores tratamiento ( $p < 0.05$  y  $p < 0.0001$  respectivamente) y sexo ( $p < 0.0001$  en ambos casos). No se encontraron en este período, sin embargo, variaciones apreciables a lo largo de los días. No fueron tampoco significativas las interacciones entre los factores. Al no haber diferencias entre los días se agruparon los datos de cada grupo experimental durante este período y se compararon conjuntamente mediante el test de Duncan. El análisis *post-hoc* reveló como significativa la diferencia en el consumo alimentario entre machos tratados y controles (una diferencia media de 1g más por día los tratados) pero no entre las hembras (0,25g más las tratadas). En cuanto al consumo de agua tanto los machos como las hembras tratados presentaron valores mayores que los controles (una media de 3ml diarios más). Las diferencias sexuales para ambas variables fueron significativas tanto en los animales tratados como en los controles (una media 8g para la alimentación y de 2ml para la bebida).

#### IV.4.4 EVOLUCIÓN PONDERAL

Se observó que al elegir la camadas al azar para formar parte del grupo tratado con naltrexona o del grupo control, las camadas destinadas al tratamiento fueron las que presentaron desde el nacimiento un mayor peso corporal (análisis de *t* de Student:  $p < 0.05$ ).

Sabemos por observaciones anteriores que el peso dado por los animales al nacimiento parece condicionar su evolución ponderal posterior durante el período predestete. Por ello, y para obviar esta posible interferencia con el efecto del tratamiento, decidimos hacer relativos los datos recogidos durante este período al peso de los animales al nacer, cuando aún no han sido tratados. A esta transformación de los datos la hemos denominado *tasa de crecimiento*. El análisis de varianza de esta variable reveló como significativos los efectos del tratamiento con naltrexona ( $p < 0,05$ ), sexo ( $p < 0,01$ ) y la edad ( $p < 0,0001$ ). Las interacciones entre los factores no fueron significativas. Con independencia del sexo, los animales controles mostraron tasas mayores que los tratados (un promedio de 5% más) (Fig. 38a). Lo que sucedió con el peso absoluto en los grupos tratados es que, estas camadas, al nacer, fueron más pesadas (por azar, puesto que no habían sido inyectadas todavía). Sin embargo, por efecto del tratamiento, esta diferencia con los controles se fué reduciendo a lo largo de los días, de modo que, a partir del día 12 y hasta el 22, mostraron valores menores que los controles. Además, tanto las hembras tratadas como las controles, presentaron valores mayores para este parámetro que los machos (un promedio de 3% más), aunque sus pesos absolutos fueron siempre inferiores a los de los machos. Con respecto a la edad, el análisis *post-hoc* indicó que la tasa de crecimiento se incrementó significativamente en cada día observado.

En cuanto a los pesos recogidos a edades comprendidas entre el período postdestete y la edad adulta (Fig. 38b), también se encontraron efectos significativos para los factores tratamiento, sexo y edad ( $p < 0,0001$  para todos ellos), así como para la interacción sexo x

edad ( $p < 0,0001$ ). Los animales tratados tanto machos como hembras presentaron mayores pesos corporales que sus respectivos controles (un incremento medio de un 3%). Por lo que se refiere a las diferencias sexuales, los machos, con independencia de su tratamiento, pesaron más que las hembras (una diferencia media de un 38% más). La interacción sexo x edad se manifiesta en un aumento de las diferencias entre machos y hembras con la edad (oscila entre un 6% de peso más en los machos que en las hembras a los 30 días de edad y un 58% a los 79 días). Los pesos se incrementaron significativamente a cada edad estudiada en todos los grupos.

#### IV.4.5 TABLAS Y GRÁFICAS

# EFFECTOS DEL TRATAMIENTO PREDESTETE CON NALTREXONA SOBRE EL DESARROLLO DEL CEREBELO

**TABLA 25. PESO DEL CEREBELO (mg)**

	7 días	14 días	22 días	Adultos
♂♂				
CONTR	49,8±1,5	144,5±2,2	194,3±4,3	286,1±5,6
NALTX	57,8±1,4*	147,8±2,7	193,0±2,3	287,1±4,7
♀♀				
CONTR	49,9±2,7	144,1±2,3	193,0±4,5	264,0±3,6
NALTX	55,7±1,5*	146,6±1,8	184,9±4,5	267,1±4,1

**TABLA 26. CONTENIDO DE ADN CEREBELAR (μg/mg tejido)**

	7 días	14 días	22 días	Adultos
♂♂				
CONTR	5,41±0,16	7,32±0,11	6,27±0,31	4,40±0,14
NALTX	6,38±0,14*	7,81±0,15	6,07±0,22	4,22±0,09
♀♀				
CONTR	5,11±0,29	7,50±0,21	6,13±0,12	4,63±0,09
NALTX	6,23±0,16*	7,48±0,16	6,11±0,15	4,37±0,07

**TABLA 27. CONTENIDO DE PROTEÍNAS CEREBELARES (μg/mg tejido)**

	7 días	14 días	22 días	Adultos
♂♂				
CONTR	64,7±4,0	95,7±2,7	99,9±6,6	125,6±2,4
NALTX	72,3±3,5	100,5±2,1	111,6±2,5	123,5±1,7
♀♀				
CONTR	64,2±5,7	101,2±4,5	109,4±2,6	122,9±1,5
NALTX	77,9±2,4*	91,6±2,1*	105,7±2,8	122,6±2,3

Los valores representan la media ± e.e.m. de 6-17 medidas. \*p<0,05 frente al grupo control correspondiente de la misma edad (prueba de Duncan).



EFFECTOS DEL TRATAMIENTO PREDESTETE CON NALTREXONA SOBRE  
EL DESARROLLO DEL CEREBELO (continuación)

**TABLA 28. NÚMERO DE NÚCLEOS CEREBELARES (millones)**

	7 días	14 días	22 días	Adultos
♂♂				
CONTR	43,1±2,0	170,6±3,8	197,0±12,0	202,8±7,7
NALTX	59,4±1,9*	186,6±6,1	189,5±8,1	195,2±5,6
♀♀				
CONTR	44,4±4,5	174,1±5,1	190,5±4,7	197,0±4,6
NALTX	55,9±1,8*	176,6±4,0	182,3±7,3	188,0±3,3

**TABLA 29. RAZÓN PROTEÍNAS/NÚCLEO EN EL CEREBELO**

	7 días	14 días	22 días	Adultos
♂♂				
CONTR	75,6±7,2	81,2±2,1	98,8±4,9	180,2±7,1
NALTX	70,1±2,5	80,0±1,7	115,5±3,9*	182,3±3,5
♀♀				
CONTR	87,8±9,2	84,0±3,7	111,0±3,4	165,5±3,2
NALTX	77,6±1,8	76,6±3,0	106,1±3,2	174,5±4,0

Los valores representan la media  $\pm$  e.e.m. de 5-17 observaciones. \* $p < 0,05$  frente al grupo control correspondiente de la misma edad (prueba de Duncan).

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Parámetros cerebelares al día 7 (I)

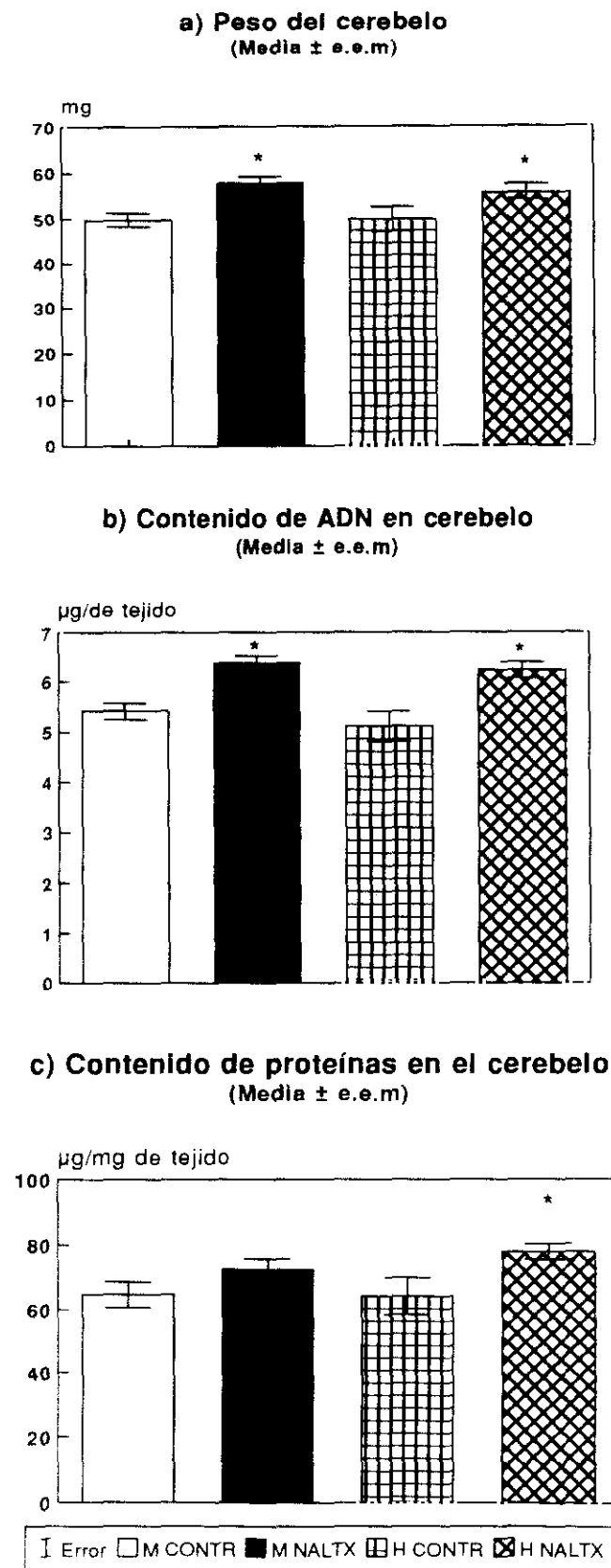
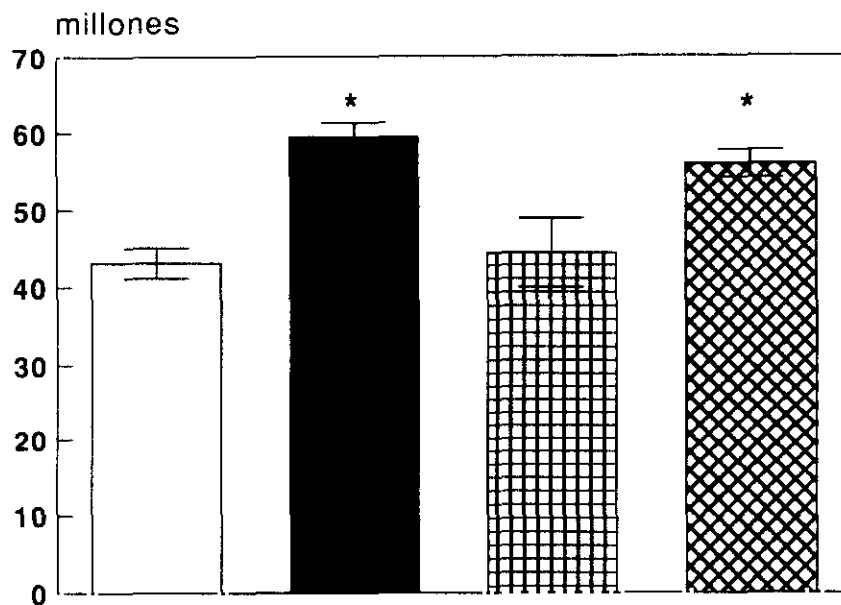


FIG. 33. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 6-12 medidas. \* $p < 0,05$  frente al grupo control correspondiente (prueba de Duncan)

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Parámetros cerebelares al día 7 (II)

### a) Número de núcleos cerebelares (Media $\pm$ e.e.m)



### b) Razón proteínas/núcleo en el cerebelo (Media $\pm$ e.e.m)

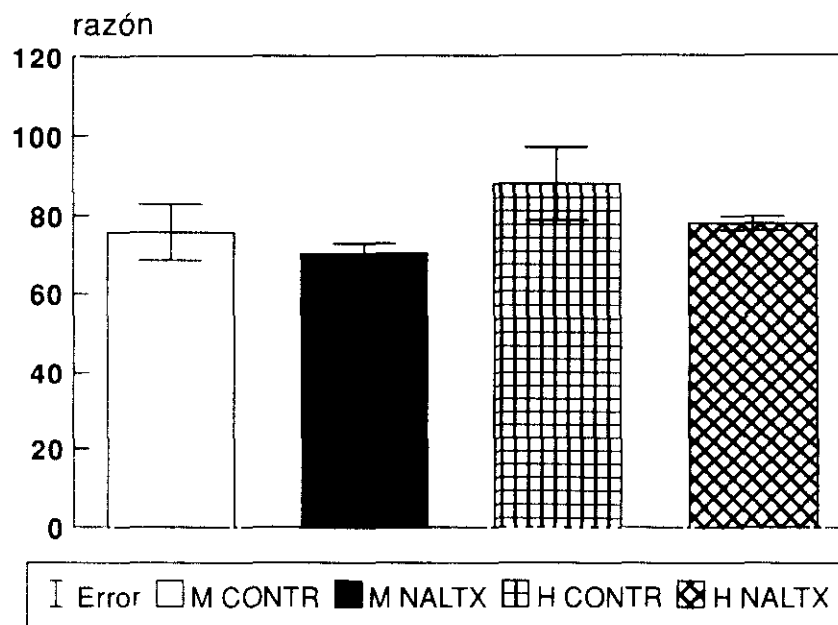


FIG. 34. Los histogramas representan la media  $\pm$  e.e.m de 6-12 observaciones.  
\* $p < 0,05$  frente al grupo control correspondiente (prueba de Duncan)

## Efectos del tratamiento con NALTx

### Aparición de la apertura ocular bilateral (Media de %)

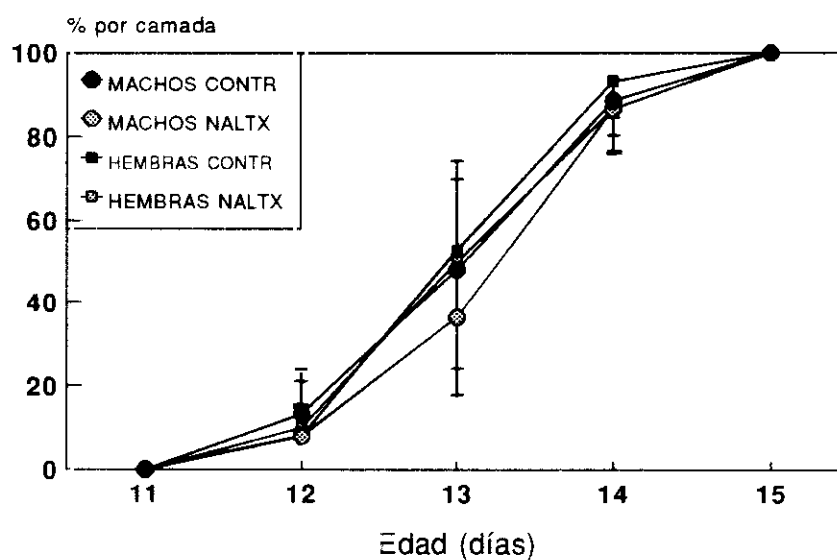
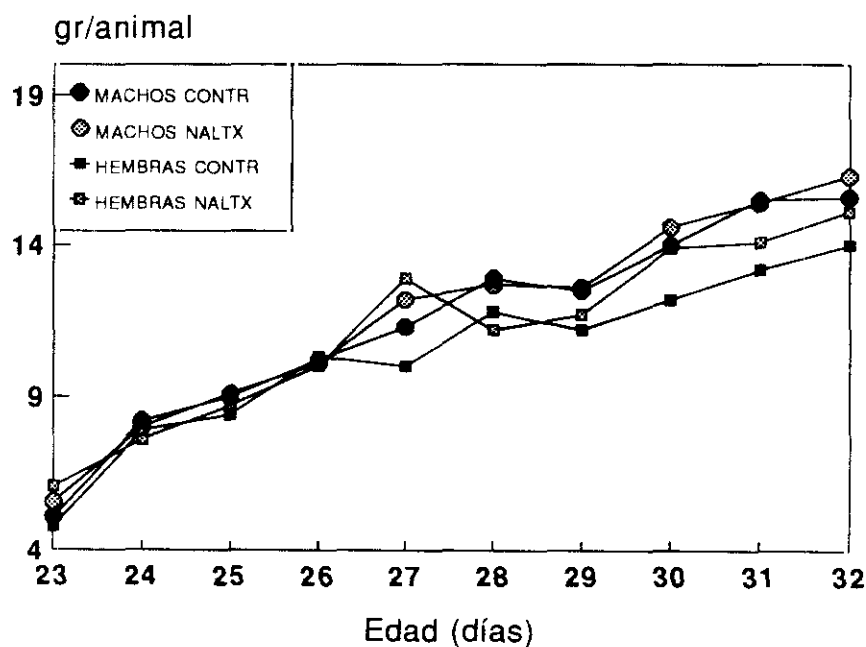


FIG. 35. Cada punto representa la media  $\pm$  e.e.m. del porcentaje de crías por camada con los dos ojos abiertos observado en cada uno de los días (cinco camadas por grupo experimental)

# Efectos del tratamiento con NALTx

## Ingesta (período postdestete)

### a) Evolución del consumo alimentario



### b) Evolución del consumo de agua

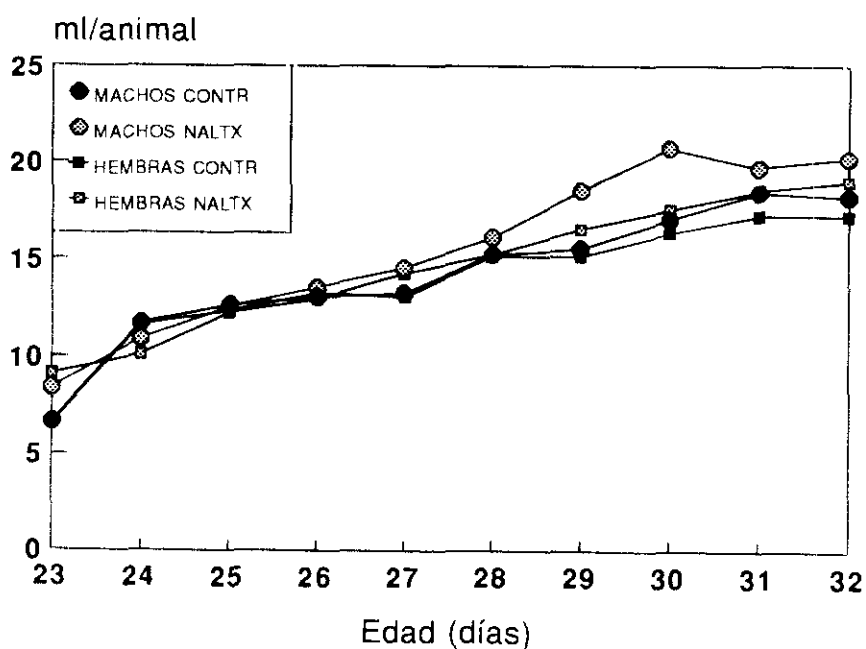
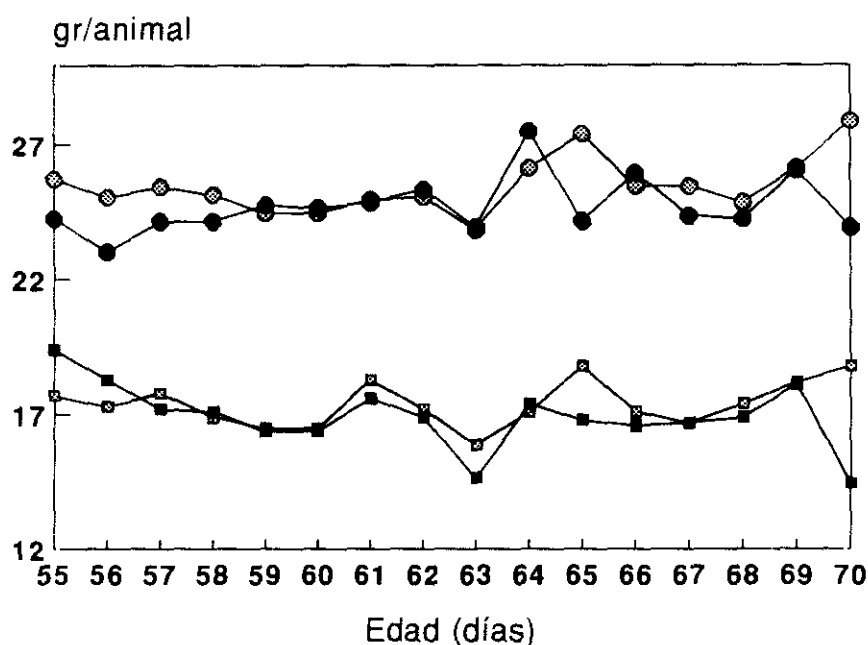


FIG. 36. Cada punto representa la media de 3 observaciones. Significación del ANOVA para el tratamiento con NALTx: a)  $p < 0,01$ ; b)  $p < 0,001$

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Ingesta (período peripuberal)

### a) Evolución del consumo alimentario



### b) Evolución del consumo de agua

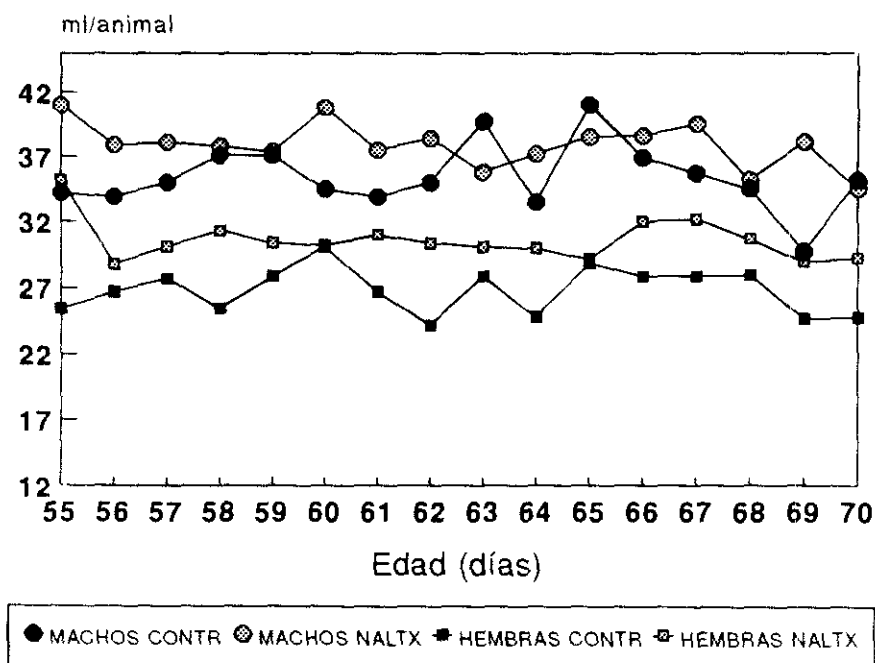
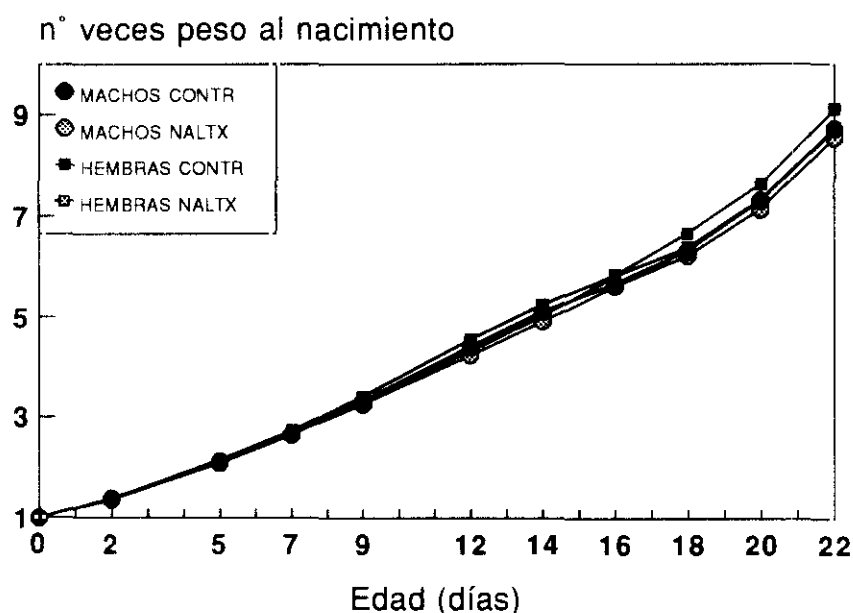


FIG. 37. Cada punto representa la media de 3 observaciones. Significación del ANOVA para el tratamiento con NALTX: a)  $p < 0,05$ ; b)  $p < 0,0001$

# Efectos del tratamiento con NALTX

## Crecimiento somático

### a) Tasa de crecimiento Período predestete



### b) Peso corporal Período postdestete-adulto

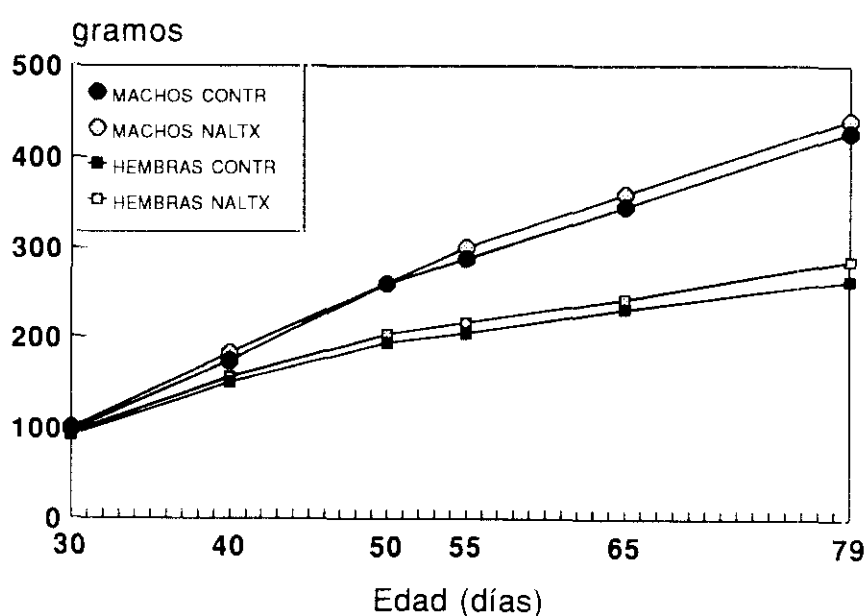


FIG. 38. Cada punto representa la media de a) 5-9; b) 15-17 observaciones.  
Significación del ANOVA para el tratamiento con NALTX: a)  $p < 0,05$ ; b)  $p < 0,001$

#### IV.4.6 DISCUSIÓN

La elección del cerebelo como parámetro de control de los posibles efectos del bloqueo opioide sobre el crecimiento neural parece justificada de acuerdo con la literatura. Por un lado, los picos de concentración de  $\beta$ -endorfina y de sitios de unión para opioides en esta región del encéfalo tienen lugar durante la primera semana de vida decendiendo posteriormente hacia la edad adulta (Maseda y col. 1983; McDowell y Kitchen 1987; Tsang y col. 1982ab). Además, la proliferación de las microneuronas cerebelares parece circunscribirse fundamentalmente a las tres primeras semanas de vida postnatal (Altman 1972). Más aún, se ha descrito en estudios morfológicos que el número de células en esta región encefálica se multiplica aproximadamente por 15 desde el nacimiento al día 21 (Zagon y McLaughlin 1979). Nuestros datos en cuanto al número de núcleos (y por tanto de células) procedentes de la valoración bioquímica de ADN indican una progresión similar en los animales controles, aunque los valores obtenidos son marcadamente superiores a los del mencionado trabajo. Los valores numéricos encontrados por nosotros están más en consonancia con otro estudio en que se empleó la misma técnica bioquímica para en encéfalo fetal (Arahuetes y col. 1991), por lo que el desacuerdo en cuanto a los valores absolutos con el mencionado trabajo de Zagon y McLaughlin de 1979 podría ser debido a la distinta técnica empleada.

Los efectos del tratamiento respecto a las variables estimadas para el desarrollo del cerebelo parecen bastante coherentes entre sí, particularmente en lo que se refiere a los



resultados al día 7. Así, para esta edad se producen aumentos tanto en la concentración de ADN -y, por tanto, en el número de núcleos- como en la concentración de proteínas. Consistentemente con esto, la razón proteínas por núcleo no sufre variación. El efecto del tratamiento en los machos no se manifiesta de forma patente a los 14 días de edad (aunque numéricamente al menos, hay todavía una pequeña elevación). Sin embargo, tendría un efecto depresor del contenido de proteínas totales en las hembras, apareciendo aquí un posible efecto distinto del tratamiento con naltrexona según el sexo, que podría tener secuelas hasta el día 22. Esto estaría apoyado por la interacción sexo x tratamiento que sí resulta claramente significativa a los 22 días para la razón proteínas/núcleo. En principio, el tratamiento no causaría ya elevación en la edad adulta, si no que en el caso de la concentración de ADN (también en el número de núcleos, aunque sin significación estadística), produciría una reducción.

La interpretación de estos resultados debe hacerse desde una perspectiva del efecto del tratamiento sobre la evolución en el desarrollo de estos parámetros. De forma global podría interpretarse que el tratamiento neonatal con naltrexona produce una cierta aceleración del desarrollo del cerebelo, siendo este efecto particularmente marcado durante la primera semana de vida postnatal. Así, la aparente caída del efecto con la edad, podría explicarse como el progresivo alcance de un techo de maduración, llegando a los niveles del adulto. Esto queda particularmente bien ilustrado con los resultados del desarrollo para el número de núcleos. Este parámetro experimenta un fuerte crecimiento de los días 7 al 14, y posteriormente se producen incrementos de menor cuantía hasta alcanzar una *meseta*

o valor máximo teórico. Mientras que en los grupos controles se produce un aumento significativo del número de núcleos a partir del día 14, en los animales tratados de ambos sexos, se alcanza un valor que no difiere significativamente del adulto ya a los 14 días. También apoyan esta interpretación los datos de la concentración de ADN por mg de tejido, aunque de forma menos gráfica. Este adelanto en el desarrollo se manifiesta de forma estadística por la similitud de niveles a los días 7 y 22 en los animales tratados (son significativamente distintos en los grupos controles), lo que indica indirectamente que al día 7 los grupos tratados se encontraban en un punto más avanzado de la curva de desarrollo. Por otro lado, parece ser que los animales tratados, no llegan a alcanzar completamente los valores de los grupos controles para estos dos parámetros en la edad adulta. Es posible que esto sea un pequeño efecto secundario de lo que, en definitiva, son anomalías producidas por la naltrexona en el desarrollo normal durante el período predestete. De igual manera, cabe interpretar los datos de contenido de proteínas según su evolución con la edad, aunque el tratamiento parece afectar de forma distinta a cada sexo. En general, en los grupos controles se produce un aumento significativo en este parámetro del día 7 al 14, y desde los 22 días a la edad adulta, con pequeños incrementos entre los días 14 y 22 (sin significación estadística). Sin embargo, en los grupos tratados se producen incrementos significativos a todas las edades. Mientras que en los machos tratados esto puede atribuirse a una aceleración del desarrollo (tienden a presentar valores mayores que sus controles a esas edades), en las hembras tratadas el efecto es más complejo: hay una caída de la concentración de proteínas a los 14 días (presentan valores menores que las hembras controles). No sería muy consistente hablar de *retraso* en las

hembras dado que el fenómeno de aceleración del crecimiento parece claro a los 7 días para todos los parámetros, y siempre en cuanto número de núcleos y ADN en este grupo. Por otra parte, la consecución de valores similares a los controles parece hacerse de forma bastante rápida y completa. En lo que se refiere a la razón proteínas/núcleo, el efecto de adelantamiento del desarrollo parece patente en los machos tratados. Mientras en los machos controles la elevación de este cociente es gradual del día 7 al 22, este aumento es progresivo en los machos tratados, indicando que avanzan hacia el valor de los adultos a mayor velocidad. Esta diferencia de perfiles no se da entre las hembras tratadas y controles. Ello probablemente se debe al efecto depresor del tratamiento con naltrexona sobre las proteínas al día 14. A ello se une el hecho de que la evolución de este parámetro parece adelantarse en las hembras controles frente a los machos. Aparte de esta diferencia en el perfil de desarrollo, cabe señalar que las únicas diferencias sexuales significativas en este conjunto de variables se dieron en la edad adulta y en aquellos parámetros que implican al cerebelo de forma más global (peso fresco y razón proteínas núcleo).

Puede decirse en conjunto que el tratamiento neonatal con naltrexona parece adelantar el crecimiento del cerebelo y el desarrollo de la proliferación celular (valorada a través de los resultados de concentración de ADN y número de núcleos), aunque los animales tratados no alcanzarían completamente los niveles de ADN de los controles en la edad adulta. El tratamiento también parece acelerar el desarrollo del contenido de proteínas y de la razón proteínas/núcleo en los machos. En las hembras el efecto del tratamiento sobre estos dos últimos parámetros es más complicado. Aparentemente, acelera

el desarrollo del contenido de proteínas durante la primera semana y deprime este parámetro a los 14 días, alcanzando los valores de las controles en la edad adulta; y no modifica el perfil general de la razón proteínas/núcleo. Este cociente suele interpretarse como indicador de tamaño y/o de diferenciación celular (Arahetes y col. 1991; Carretero 1989, Tesis de Licenciatura). Podría concluirse que el tratamiento ha afectado ambos procesos del desarrollo -proliferación y diferenciación celular- con un efecto distinto según el sexo para este último. Con respecto a este último resultado, sería interesante recordar que se vió un descenso en el contenido de proteínas a los 7 días de edad por efecto de la inyección de  $\beta$ -FNA al nacimiento, en ambos sexos (ver sección IV.1.2).

Estos resultados están básicamente en la línea de lo sugerido por otros autores, según lo cual los opioides podrían ejercer un papel regulatorio del crecimiento a través de mecanismos inhibitorios, como reguladores negativos del crecimiento. Además, estos péptidos opioides actuarían de forma tónica (Zagon y McLaughlin 1992). Se han descrito distintas acciones para el bloqueo opioide durante el desarrollo, dependiendo de si éste es crónico (durante las 24hr del día, dosis altas: 50 mg/kg) o temporal (4-6hr, dosis más bajas: 1mg/Kg). Así por ejemplo, se ha observado que la administración neonatal de naltrexona de forma crónica (50 mg/kg) produce incrementos del desarrollo somático y neurobiológico (Zagon y McLaughlin 1984, 1986ab). Por contra, se ha encontrado que el bloqueo temporal inhibe el crecimiento corporal y del encéfalo (Zagon y McLaughlin 1984) así como del cerebelo (Zagon y McLaughlin 1986b). Sin embargo, no se han observado estos efectos inyectando a las ratas neonatales con otro antagonista opioide

general, la naloxona (1mg/Kg dos inyecciones diarias desde el día 1 de vida), aunque una inyección diaria de morfina (agonista opioide exógeno inespecífico) (a una dosis de 5mg/Kg) disminuyó los pesos encefálico y corporal a los 22 días de edad (Bardo y col. 1982). Los animales tratados crónicamente con naltrexona durante la embriogénesis muestran mayor número de neuronas y glía encargada de la proliferación, incremento en las formaciones dendríticas y sinaptogénesis (Zagon y McLaughlin 1986b, 1987, 1991; Hauser y col. 1987, 1989; Isayama y col. 1991). Consistentemente con esto, la administración de morfina reduce el crecimiento dendrítico basilar en neuronas corticales (Hammer y col. 1989). Cabría decir que un efecto sobre las formaciones dendríticas y la sinaptogénesis sería una de las posibles explicaciones para las variaciones vistas por nosotros en el contenido de proteínas cerebelares. El control de la proliferación celular podría ser también uno de los objetivos de esta función opioide: se ha encontrado que los opioides endógenos reducen la mitosis y la síntesis de ADN en células neurales (Vertes y col. 1982; Zagon y McLaughlin 1987, 1991) y que la morfina administrada a las ratas de 1 día de edad inhibe la incorporación de timidina tritiada al ADN encefálico, un efecto antagonizado por naloxona (Loughlin y col. 1985; Kornblum y col. 1987). Consistentemente con estos hallazgos, se ha observado en cerebelo inmunoreactividad opioide en células neurales germinales y no en las diferenciadas (Loughlin y col. 1985; Zagon y McLaughlin 1990b), y que esta actividad está relacionada con la mayoría de los orgánulos de las células en proliferación (Zagon y McLaughlin 1990b). Es más parece haberse detectado un receptor para Met-enkefalina (péptido agonista opioide endógeno) en tejido cerebelar en desarrollo, que estaría situado en el núcleo de la célula neural: el

receptor zeta ( $\zeta$ ) (Zagon y McLaughlin 1991). Los datos de nuestro trabajo referentes a cerebelo no confirman los resultados anteriores para el bloqueo opioide transitorio. Por contra indican un efecto opuesto, es decir una estimulación del crecimiento más similar a la encontrada para el bloqueo crónico por otros autores (Zagon y McLaughlin 1984, 1986b). Sin embargo, en nuestro caso el efecto de aceleración es evidente sobre todo en la primera semana de vida, mientras que dichos autores observan los efectos a los 21 días. Hay que tener en cuenta, además, que nuestros animales recibieron el tratamiento durante la fase oscura del ciclo (mientras que en estos trabajos se administró la naltrexona en la fase lumínica), ya que se han observado diferencias en el número de receptores opioides en distintas regiones encefálicas, así como del contenido de dinorfina (Giardino y col. 1990) y  $\beta$ -endorfina (Trentini y col. 1991) hipotalámicas, durante una y otra fase en animales adultos. Sí coinciden nuestros datos en lo referente al tiempo durante el que la naltrexona es capaz de actuar sobre el crecimiento del cerebelo: las 3 primeras semanas de vida, que es cuando tienen lugar la proliferación y la diferenciación (Zagon y McLaughlin 1986b). Además, los mayores efectos que aparecen en nuestro trabajo tienen lugar en la primera semana de vida, que es el período durante el que se alcanza el máximo desarrollo del sistema opioide en el cerebelo (para revisión ver McDowell y Kitchen 1987), lo que haría esperable esa mayor repercusión del tratamiento. Nuestro estudio ofrece una panorámica más dinámica de los efectos del bloqueo opioide sobre el desarrollo postnatal, puesto que se han hecho mediciones en tres edades durante el período predestete, además de en la edad adulta. Los trabajos previos se refieren generalmente a resultados obtenidos en un sólo punto del desarrollo. Este trabajo aporta también datos complementarios de

otras investigaciones al hacer una valoración bioquímica conjunta de ADN y proteínas (la mayoría de los estudios anteriores en cerebelo son fundamentalmente morfológicos) y presenta la novedad de apuntar un posible efecto dependiente del sexo sobre el contenido de proteínas cerebelares.

Aunque por lo referido anteriormente no puede excluirse que los efectos observados sobre el crecimiento somático (en particular la tasa de crecimiento, en el período predestete) se deban a un efecto del bloqueo opioide neonatal, al menos en parte, no debe descartarse la hipótesis alternativa de un efecto indirecto a través de la ingesta. Las menores tasas de crecimiento encontradas para los animales antes del destete podrían explicarse por un efecto directo del bloqueo intermitente por naltrexona sobre el crecimiento somático (Zagon y McLaughlin 1984). Sin embargo esto podría ser un efecto diferido, dado que se ha observado que la administración del antagonista opioide naloxona en la misma dosis empleada por nosotros a crías de rata hace que éstas dejen de mamar durante el tiempo de acción del fármaco (Sewell 1980), aunque este efecto sólo ha sido observado por otros autores para altas dosis de naltrexona (50mg/Kg, Zagon y McLaughlin 1984). En relación con esto, también es conocido que entre los síntomas del síndrome de abstinencia neonatal en humanos, está la desorganización del reflejo de mamar (Desmond y Wilson 1975). Así, el descenso en la tasa de crecimiento podría deberse a que la naltrexona hubiera inhibido parcialmente el comportamiento alimentario de los animales. En este sentido habría que apuntar otras consecuencias que podrían derivarse de este hecho: la leche contiene opioides (casomorfina) (para revisión ver Cooper y col. 1986;

Millan y col. 1991; Sewell 1980; Winslow e Insel 1991) y la ingestión de leche parece causar analgesia de tipo opioide en crías de rata (Blass y Fitzgerald 1988). Por último, debe señalarse que los efectos encontrados fueron menores que los encontrados por otros autores para este mismo fármaco a los 21 días (Zagon y McLaughlin 1984). Quizá ello sea debido a que ha debido compensarse la diferencia de peso contraria de las camadas destinadas al tratamiento con naltrexona, como ya se comentó en el apartado de resultados. Por lo que se refiere a los aumentos de peso encontrados en las edades postdestete hasta la edad adulta, la posibilidad de que se deban a un cambio inducido en la ingesta se apoya en nuestros propios datos. Como se recordará el consumo de comida y bebida es superior en los animales tratados con naltrexona en los dos períodos estudiados (tras el destete y en el período peripuberal). Esta interpretación coincide con las apreciaciones de otros autores (Zagon y McLaughlin 1990a). Una explicación comportamental podría verse apoyada por el hecho observado de que los opioides endógenos están implicados en el control de la ingesta en la rata (Giargino y col. 1990; Levine y col. 1985; Morley y col. 1983) y otras especies (De Pedro y col. 1993; Kavaliers y Hirst 1987). Con respecto a los antagonistas empleados en la rata adulta se ha visto que la naloxona suprime la alimentación y la bebida tras ayuno o glucoprivación (Brown y Holtzman 1979; Cooper 1980; Frenk y Rogers 1979), y tanto la naloxona como la naltrexona reducen la ingesta de dietas apetecibles (Apfelbaum y Mandenoff 1981; Cooper y col. 1985ab). Además el antagonismo selectivo, también en ratas adultas, de los receptores  $\delta$  (Arjune y col. 1991; Cotton y col. 1984) y de los receptores  $\mu$  (Arjune y col. 1990; Morley y col. 1983; Ukai y Holtzman 1988) deprime la ingesta *ad libitum*, mientras que la activación de los receptores opioides



por morfina, o agonistas específicos de receptor  $\kappa$ ,  $\delta$  (por ejemplo, Simone y col. 1985) o específicos de receptor  $\mu$  (Levine y col. 1991a) producen hiperfagia. Así, es posible que los animales tratados tuvieran incrementado el tono opioide relacionado con el control de la ingesta como una especie de efecto *rebote* o fenómeno supercompensatorio a causa del bloqueo predestete que se mantuviera tras el cese del tratamiento hasta la edad adulta. También se podría especular que fuera un correlato de los resultados encontrados en nuestras pruebas comportamentales: los animales tratados mostraron un mayor grado de ansiedad en el laberinto en cruz y mayor emotividad o miedo en el campo abierto, y es conocido que el estrés o ansiedad pueden inducir un incremento de la ingesta tanto en diversas especies animales como en los seres humanos (Bohus y col. 1991; Gray 1971a, 1991; Kavaliers y Hirst 1987; Morley 1991; Silvestrini y Paga 1991; Tazi y col. 1985, 1986, 1987). Es más, se ha sugerido la implicación del sistema opioide (estimuladora) en la inducción de la ingesta por estrés (para revisión ver Kavaliers y Hirst 1987; Morley 1991). El indicio encontrado de un posible efecto menor del tratamiento para las hembras en el período peripuberal-adulto en cuanto al consumo de comida (pero no de agua) es coherente con un trabajo anterior en que se observaron similares diferencias sexuales para estos parámetros en animales sometidos a ejercicio forzado (Nance y col. 1977).

Finalmente, conviene recordar que no parece que el tratamiento haya afectado a la aparición de la apertura ocular bilateral, aunque la variabilidad de los datos para este parámetro entre las camadas hace que sea difícil que se puedan encontrar significaciones salvo para efectos muy marcados. Cabe señalar, sin embargo que la apertura se adelantó

1 día en nuestros animales frente a lo encontrado por otros (Wier y col. 1989; Illera y col. 1991) y llama la atención la similitud de las medias (e incluso de la dispersión de los datos) entre nuestros resultados y los encontrados en otro trabajo (Wier y col. 1989). Este adelanto podría ser un efecto de la manipulación neonatal que supone la inyección diaria durante el destete. Otros posibles efectos de esta manipulación neonatal han sido indicados y discutidos en el apartado correspondiente a los estudios comportamentales (IV.3.4 Discusión) (Ader y col. 1960; Ardila y col. 1977; Cross y Labarba 1978; Denenberg 1964; Denenberg y Zarrow 1971; File 1978b; Gray 1971ab, 1991; Hernández 1984, Tesis Doctoral; Levine 1962; Levine y col. 1956, 1967; McCarty y col. 1981; Meaney y col. 1985; Vázquez y Akil 1992; Villescas y col. 1977).

En esta parte del estudio hemos recogido y combinado las sugerencias y aportaciones de otros autores para tratar de ofrecer un panorama completo de parámetros de control para tratamientos neonatales de tipo farmacológico (Zagon y McLaughlin 1990a, Wier y col. 1989). La coherencia y complementariedad de los resultados obtenidos así como el amplio espectro abarcado parecen justificar la elección del diseño empleado.

## **V. DISCUSIÓN GENERAL**

La investigación llevada a cabo a partir del descubrimiento de los diferentes componentes del sistema opioide endógeno (SOE) ha revelado la implicación de dicho sistema en una amplia variedad de funciones básicas así como en la expresión de una numerosa gama de comportamientos. Paralelamente, se ha demostrado la amplia distribución tanto de los receptores como de los péptidos opioides en diversas zonas del sistema nervioso central directamente implicadas en la integración de las funciones vegetativas y en el control y regulación de las respuestas adaptativas del individuo en su interacción con el medio ambiente, incluidas las interacciones sociales. Coherentemente con estos hallazgos, se ha demostrado la coexistencia e importantes interacciones funcionales entre el SOE y otros sistemas neuroendocrinos que asimismo desempeñan diversos papeles en las funciones de regulación y coordinación.

A los estudios en animales adultos -la mayoría de ellos en roedores- han seguido los estudios sobre el desarrollo del SOE en animales neonatos. Dentro de este contexto, se han realizado una serie de trabajos -ya comentados en la *Introducción*- que mediante la utilización de tratamientos farmacológicos de tipo opioide y diversas técnicas bioquímicas, fisiológicas y comportamentales han llevado a la idea de que los receptores opioides dentro del sistema nervioso central presentan una plasticidad única durante el período en el que están en rápido desarrollo ontogenético. A su vez, esta serie de estudios llevan a plantear la posible existencia de períodos críticos en el desarrollo de SOE durante los cuales, tanto el propio sistema opioide, como otros estrechamente relacionados, se vean afectados por diversos tratamientos neonatales. Desde esta presunción, resulta plausible que

la inercia de los posibles efectos de tales tratamientos se manifieste como alteraciones permanentes en la edad adulta.

De acuerdo con los objetivos planteados en el presente trabajo, ya expuestos en el apartado correspondiente, enfocamos nuestros primeros estudios al análisis de los efectos de un tratamiento social escasamente utilizado -el aislamiento sexual- y de un antagonista  $\mu$  opioide específico e irreversible, la  $\beta$ -funaltrexamina ( $\beta$ -FNA), sobre el desarrollo del receptor  $\mu$  en cerebro entero y la nocicepción. Conviene señalar que este trabajo ha aportado la primera evidencia directa de que la  $\beta$ -FNA alcanza y se une a los receptores  $\mu$  encefálicos en edades tempranas (comienzos de la primera y segunda semanas postnatales) del desarrollo. Nuestros resultados indican que el aislamiento sexual puede producir un descenso en el número de receptores y posiblemente su retraso en el desarrollo de los mismos, y que este efecto se manifiesta concretamente durante las dos primeras semanas postnatales. El estudio de los efectos de la  $\beta$ -FNA ha producido evidencia adicional sobre la plasticidad única del receptor  $\mu$  durante ese mismo período temprano del desarrollo, que parece por tanto ser crítico, lo cual está de acuerdo con evidencias previas (Bardo y col. 1982, 1983; Tempel y col. 1988; Zadina y col. 1985). De hecho, una única inyección del fármaco en el día 7 de vida postnatal produjo una disminución considerable en el número de receptores una semana más tarde. Los estudios paralelos sobre nocicepción indicaron que tanto el aislamiento sexual como la  $\beta$ -FNA afectan a las respuestas nociceptivas tanto a los 7 como a los 14 días de edad, mostrándose la prueba con estímulo térmico más sensible que la que utiliza un estímulo mecánico a los efectos

del aislamiento sexual. Además, nuestros resultados sugieren que la combinación de ambos tratamientos puede producir efectos compensatorios sobre los umbrales nociceptivos. Las complejas interacciones entre los diversos receptores opioides y otros sistemas neuroendocrinos en la modulación del dolor podrían contribuir a explicar la falta de una correlación clara entre los efectos sobre el receptor  $\mu$  y las modificaciones en la nocicepción. Desde un punto de vista metodológico, nuestros resultados apoyan la necesidad de valorar otros parámetros en este tipo de estudios. En concreto, han aparecido interesantes efectos colaterales sobre las proteínas de membrana totales que pueden ser de interés para trabajos posteriores. Conviene además destacar que las modificaciones metodológicas introducidas por primera vez en esta Tesis Doctoral en la prueba de inmersión de la cola suponen un avance interesante y de gran utilidad en la adaptación de las pruebas nociceptivas a los estudios de desarrollo.

Existe hoy día un gran número de datos experimentales que demuestran las estrechas relaciones funcionales entre el SOE y los sistemas monoaminérgicos. Sin embargo, han sido menos estudiadas las consecuencias que la plasticidad única del SOE durante el desarrollo temprano pueda tener sobre el funcionamiento de dichos sistemas de neurotransmisión. Es más, los trabajos previos en que se administraba un antagonista opioide -la naloxona- durante el período predestete no revelaron efectos significativos del tratamiento sobre los niveles de NA, DA, ó 5-HT en diversas áreas encefálicas estudiadas en ratas de 22 días de edad (Bardo y col. 1982). La utilización en el presente trabajo de otro antagonista opioide de más larga duración -la naltrexona- y el hecho de haber

realizado un estudio continuado desde los primeros días postnatales (día 7) hasta la edad adulta han demostrado, por el contrario, notables efectos del bloqueo funcional del sistema opioide sobre los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en tres regiones encefálicas especialmente relevantes: estriado, hipotálamo y mesencéfalo. Además, se ha puesto de manifiesto la inercia de algunos de estos efectos hasta la edad adulta. Nuestros datos indican efectos diferenciales del tratamiento dependiendo del sistema monoaminérgico, de la región encefálica concreta y del período del desarrollo postnatal que se trate. La complejidad de los efectos encontrados podría explicarse, al menos en parte, por la diversidad de receptores opioides afectados (al emplearse un antagonista de tipo general) así como por posibles fenómenos de supersensibilización al término del tratamiento con el antagonista. En todo caso, nuestros resultados sugieren que los opioides endógenos podrían desempeñar un importante papel modulador sobre el desarrollo y establecimiento de otros sistemas de neurotransmisores, particularmente los sistemas monoaminérgicos estudiados. Conviene resaltar como un hallazgo interesante del presente estudio que, mientras el sistema dopaminérgico resulta ser el más afectado durante las primeras edades estudiadas (7 y 14 días), el sistema serotoninérgico comienza a verse afectado en períodos más avanzados del desarrollo y muestra aún alteraciones en la edad adulta. Además, de las tres regiones encefálicas estudiadas, parece ser el mesencéfalo la menos vulnerable a ser afectada a largo plazo por el tratamiento con NALT<sub>X</sub>, no presentando modificaciones en cuanto a la función serotoninérgica (según los parámetros estudiados) en los animales adultos. Estos resultados podrían reflejar diferencias en el patrón de maduración de los propios sistemas monoaminérgicos y/o de sus interacciones con el SOE.

En el último gran apartado de esta Tesis Doctoral, se analizaron las consecuencias del bloqueo funcional del sistema opioide (mediante el mismo tratamiento utilizado para el estudio de las relaciones neuroquímicas) sobre la respuesta comportamental de los animales adultos ante diferentes pruebas que suponen diversas intensidades de estrés ambiental para el animal y permiten valorar distintos aspectos del comportamiento. Como se ha puesto recientemente de manifiesto, la utilización del tablero de agujeros -además del campo abierto- permite medir parámetros de significación exploratoria y discernir por tanto entre exploración que podríamos denominar *dirigida* y actividad general (Kshama y col. 1990; Lister 1987; Pellow y col. 1985; Steenbergen 1991; Wilson y col. 1991). Nuestros resultados apoyan este punto de vista y de hecho, la utilización del tablero de agujeros nos ha permitido constatar que los efectos del tratamiento neonatal con naltrexona consisten en una disminución de los parámetros claramente exploratorios en esta prueba, como son la exploración de agujeros y el tiempo de exploración, además de la deambulación interna que hemos considerado como parámetro aparte de la externa. Este criterio se ve igualmente reforzado por los resultados obtenidos. La utilización del laberinto en cruz como prueba de ansiedad (Pellow y col. 1985) en nuestro trabajo ha resultado de gran eficacia para demostrar que el tratamiento predestete con naltrexona causa un efecto específico de aumento de la ansiedad mientras que no parece afectar en esta prueba, como tampoco en el tablero de agujeros, a otros parámetros relacionados con la actividad más general o inespecífica del animal. Finalmente, la realización de la prueba de campo abierto durante tres días consecutivos y el elevado número de parámetros medidos ha proporcionado una gran riqueza de información referida a distintos aspectos del



comportamiento de los animales tratados neonatalmente con naltrexona. Además, las especiales características del estrés al que son sometidos los animales durante esta prueba, distintas de las otras dos pruebas comportamentales realizadas, han añadido, asimismo, nueva información respecto a los efectos del sexo y su interacción con el tratamiento.

Es conocida la relación de los neurotransmisores de los sistemas monoaminérgicos con diversos patrones comportamentales en el adulto. En este sentido, cabe reseñar la especial implicación del sistema serotoninérgico en las respuestas de ansiedad. Así, se han relacionado los comportamientos de tipo ansioso con elevaciones de la actividad serotoninérgica. En relación con nuestro trabajo, se ha observado que diversos compuestos agonistas de la 5-HT o potenciadores de su síntesis o recaptación hacen disminuir las entradas de las ratas adultas en en los brazos abiertos del laberinto en cruz, mientras que algunos antagonistas o inhibidores las incrementan (Kshama y col. 1990). Nuestros resultados comportamentales han demostrado de forma contundente que el bloqueo opioide durante el período predeste produce una elevación de los niveles de ansiedad mostrados por los animales en la edad adulta en la mencionada prueba. No se encontraron variaciones en la tasa de recambio de serotonina en estriado (descienden tanto 5-HT como 5-HIAA), pero se encontró una elevación de este parámetro en el hipotálamo, región más relacionada con el control de las emociones. Sin embargo, hay que considerar el hecho de que los niveles del metabolito en el hipotálamo no se modificaron frente a los encontrados en los controles, mientras que los de serotonina se redujeron, lo que hace que el significado de estas variaciones no sea fácil de interpretar en cuanto a sus posibles repercusiones

comportamentales. En este sentido, puede ser de interés mencionar que una consecuencia de la exposición a agentes estresantes como el choque eléctrico es la disminución de 5-HT en distintas regiones del encéfalo (entre ellas el hipotálamo) y el choque incontrolable produciría reducciones en la concentración de serotonina más eficazmente que el controlable (para revisión ver Anisman y Zacharko 1990). Además otros autores han encontrado un descenso en la capacidad de síntesis de 5-HT en el hipocampo de ratas sometidas a estrés prenatal (Peters 1986). Así, podría especularse que uno de los posibles correlatos neuroquímicos de las situaciones de mayor emotividad podría ser una disminución de las concentraciones de la serotonina encefálica, lo que haría que los resultados comportamentales encontrados por nosotros (aumento de la emotividad) estuviera en cierta consonancia con los obtenidos en las regiones encefálicas, especialmente en el hipotálamo, donde esta bajada supone, además, un aumento de la tasa de recambio. Por otro lado, cabe señalar, que el papel comportamental de los distintos receptores de serotonina no está del todo aclarado. Así, en algunos trabajos se ha encontrado que los antagonistas del receptor 5-HT<sub>2</sub> tienen efectos ansiolíticos (Becker 1986; Meert y Colpaert 1986), mientras que en otros se sugiere una acción ansiogénica (Kshama y col. 1990; Pellow y col. 1987). Además, se ha visto que uno de ellos, la ciproheptadina, parece incrementar la tasa de recambio de la 5-HT (Golembioska-Nikitin y col. 1977). También existe cierta controversia sobre el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, puesto que, según el agonista de este receptor (o puede que incluso la vía de administración) que se emplee, se pueden obtener efectos opuestos sobre el grado de ansiedad de los animales en el laberinto en cruz (Graeff y col. 1990; Kshama y col. 1990; Wilkinson y Dourish 1991). Todo ello viene a señalar

la complejidad de la función serotoninérgica en la regulación de los niveles de ansiedad en las situaciones de conflicto para el animal, ya señalada por otros autores (para revisión ver Wilkinson y Dourish 1991). Nuestros resultados vendrían a apoyar, al menos en parte, esta visión al ser el sistema que permanece más alterado en la edad adulta por el tratamiento, acompañado de aumentos de la ansiedad en el comportamiento en el laberinto en cruz. Por otra parte, se sabe que las anfetaminas (fármacos inductores de la liberación de catecolaminas) incrementan la actividad locomotora en la rata adulta (por ejemplo: Fukuda y col. 1977; Kelly y col. 1975; Kovács y De Wied 1978) y que las dosis de anfetamina y haloperidol (antagonista de la dopamina) capaces de afectar la actividad en el campo abierto incrementándola y reduciéndola, respectivamente) tienen un efecto sobre motilidad general, sin otros componentes emocionales (Kovács y De Wied 1978). Similares decrementos en la actividad general en campo abierto se han observado en ratas adultas tratadas neonatalmente con 6-OHDA (toxina anticatecolaminérgica) (Fukuda y col. 1977) y en la actividad en el tablero de agujeros por la inhibición de la síntesis de catecolaminas en ratas adultas (Gil y col. 1992). Así, la ausencia de efecto del tratamiento en los parámetros medidos sobre el sistema dopaminérgico en el cuerpo estriado, que presentan una mayor relación con el control motor, junto con los resultados de las tres pruebas comportamentales (en las que no se detectaron cambios en la actividad locomotora general como tal), estarían en consonancia con los datos encontrados por aquellos autores. Se ha descrito una posible implicación del sistema dopaminérgico en el *grooming* genital inducido por oxitocina en ratas adultas. Dicha interacción parece producirse a nivel extraestriatal, y, además, los cambios en ese parámetro no se vieron acompañados de

modificaciones en el atusamiento rostral (Drago y col. 1986). Más aún, otros autores no han encontrado efectos significativos sobre el atusamiento por inyección de anfetamina o haloperidol (Kovács y De Wied 1978). En nuestro trabajo se observaron cambios en el atusamiento rostral sin que aparecieran alteraciones paralelas en el sistema dopaminérgico estriatal. Estos resultados están en la línea de los datos anteriormente mencionados, y sugieren que no existe una relación entre el sistema dopaminérgico estriatal y la expresión del atusamiento rostral.

En conjunto, la batería de pruebas utilizada nos ha permitido obtener un cuadro coherente y completo de las alteraciones comportamentales como consecuencia del bloqueo funcional transitorio del sistema opioide durante el desarrollo. Esto constituye un importante avance en esta línea de investigación, ya que hasta ahora los datos disponibles se referían a aspectos muy parciales del comportamiento. El hecho de que los efectos de los tratamientos neonatales crónicos con sustancias opioides sobre la nocicepción tengan mayor duración que las alteraciones producidas en el número de receptores (para revisión ver Bardo y col. 1983; Tempel y col. 1988) han llevado a proponer que la inercia de estos efectos se deba a cambios producidos a nivel neuronal presináptico (Bardo y col. 1983). El hecho de que nosotros hayamos encontrado variaciones en los niveles de monoaminas en el animal adulto, unido a diversos cambios en parámetros comportamentales (ver apartado IV.3 *Estudios comportamentales: tratamiento con naltrexona*), podría apoyar esta hipótesis.

La valoración de una serie de parámetros de control relacionados con el desarrollo ha supuesto la aportación a este trabajo de datos complementarios de indudable interés para un estudio de este tipo en el que se emplea un tratamiento farmacológico durante edades críticas (para revisión ver Zagon y McLaughlin 1990a). Así, los resultados de las valoraciones de ADN, proteínas y peso cerebelares confirman que las edades tempranas del desarrollo presentan una especial sensibilidad al tratamiento con antagonistas opioides, en concordancia con lo encontrado en otros apartados de esta misma Tesis y por estudios anteriores (Bardo y col. 1982, 1983; Tempel y col. 1988; Zadina y col. 1985). Sin embargo, las conclusiones que se pueden obtener de nuestros datos, según las cuales el tratamiento con naltrexona podría causar un cierto adelantamiento del desarrollo neural en el cerebelo, estarían en oposición con lo observado en trabajos anteriores (para revisión ver Zagon y McLaughlin 1992). Hay que señalar, no obstante, que nuestros efectos se han encontrado fundamentalmente en la primera semana postnatal y los trabajos más comparables con el nuestro sólo han estudiado lo que sucede a los 21 días. Además, nuestro tratamiento con naltrexona ha tenido lugar durante la fase oscura del ciclo diario, mientras que en los estudios previos se administró en la fase lumínica. Puesto que se sabe que existen variaciones importantes en el contenido de opioides y sus receptores en el encéfalo entre una fase y otra (Giardino y col. 1990; Trentini y col. 1991), nuestros datos podrían ser una indicación de que, debido a dichas modificaciones en el sistema, el bloqueo opioide tendría unas consecuencias distintas sobre los parámetros de desarrollo neurobiológico dependiendo de la etapa del ciclo circadiano en que el tratamiento tenga lugar.

La menor tasa de crecimiento corporal encontrada en la etapa presdestete está básicamente en sintonía con hallazgos anteriores sobre los efectos de la naltrexona administrada de forma intermitente sobre el desarrollo somático (Zagon y McLaughlin 1984). Sin embargo, en nuestro caso -y a diferencia de aquellos autores- nosotros no descartamos la existencia de un efecto depresor del comportamiento alimentario, que ya ha sido descrito anteriormente para otro antagonista opioide en ratas neonatales (Sewell 1980). Esta interpretación se vería también apoyada por el hecho de que el efecto encontrado en este trabajo es pequeño (y menor al descrito por aquellos autores), por lo que sería menos probable que fuera consecuencia de una interferencia del tratamiento con los mecanismos generales de que regulan el crecimiento somático. Por otra parte, parece bastante claro que, posteriormente durante el desarrollo postdestete, el peso ligeramente mayor de los animales tratados se podría deber a una mayor ingesta de comida y bebida, lo que sugeriría la idea de un cambio en el comportamiento alimentario. Estos últimos resultados estarían en concordancia con el conocido papel del sistema opioide en el control de la ingesta en ratas adultas (Giargino y col. 1990; Levine y col. 1985; Morley y col. 1983) y podrían ser consecuencia de un tono opioide modificado (posiblemente aumentado) de forma permanente -al menos en lo que se refiere al control de esta función- en los animales adultos tratados neonatalmente con naltrexona. Se podría especular, además, que esta ingesta incrementada pudiera ser otra manifestación comportamental más del mayor nivel de ansiedad mostrado por los animales tratados en el laberinto en cruz o de mayor emotividad en el campo abierto. En apoyo de esta idea estarían las evidencias encontradas de que el estrés puede aumentar el consumo alimentario tanto en animales como en los

seres humanos (Gray 1971a, 1991; Kavaliers y Hirst 1987; Morley 1991; Tazi y col. 1985, 1986, 1987), así como que otros autores hayan postulado una acción potenciadora de los opioides en la inducción de la ingesta por estrés (para revisión ver Kavaliers y Hirst 1987; Morley 1991). Más aún, en relación con nuestros resultados neuroquímicos, se ha postulado también el incremento del consumo de comida podría ser debido a una alteración de la transmisión serotoninérgica (Leibowitz 1990), y se ha asociado un aumento de la ingesta a pautas de tipo ansioso y emotivo por administración de un agonista del receptor 5-HT 1A (Bohus y col. 1991).

Nuestros resultados tanto a nivel bioquímico como comportamental apoyan la idea ya sugerida por otros autores (Bardo y col. 1982, 1983; Sirinathsinghji 1985; Tempel y col. 1988; Zadina y col. 1985) y por nosotros mismos basándonos en otros resultados de este trabajo, de que parecen existir períodos críticos durante el desarrollo del sistema opioide endógeno. De hecho, nuestros datos indican que el bloqueo funcional subcrónico de dicho sistema durante el período predestete produce efectos a largo plazo tanto sobre el sistema serotoninérgico como sobre el comportamiento. Estos resultados demuestran, además, que el SOE está implicado en los mecanismos neuroendocrinos que subyacen al establecimiento de las respuestas adaptativas del animal adulto ante diversas situaciones de estrés ambiental.

Por último, conviene hacer hincapié en el interés potencial que desde un punto de vista clínico podrían tener nuestros resultados. Concretamente en relación a las posibles

repercusiones de alteraciones psicológicas o tratamientos farmacológicos que puedan modificar la funcionalidad del sistema opioide durante el período neonatal o postnatal temprano.



## **VI. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- Las edades postnatales tempranas, y en concreto, las dos primeras semanas de vida, son cruciales para el desarrollo de los receptores  $\mu$  opioides valorados en el encéfalo entero. Además, es durante este período cuando el receptor  $\mu$  parece ser más sensible al efecto del aislamiento sexual.
- 2.- Aunque no parece haber una correlación marcada entre los efectos sobre los receptores  $\mu$  y la nocicepción, el aislamiento sexual parece afectar más acusadamente a la percepción de los estímulos térmicos frente a los mecánicos.
- 3.- Tanto el aislamiento sexual como el bloqueo agudo e irreversible por la  $\beta$ -funaltrexamina del receptor durante el período neonatal pueden producir, individualmente, alteraciones en el desarrollo de los receptores  $\mu$  y el contenido de proteínas encefálicas, así como sobre la percepción de los estímulos nociceptivos térmicos. En ningún caso presentan efectos claramente sinérgicos, aunque sus acciones pueden llegar a compensarse entre sí.

- 4.- La administración de la  $\beta$ -funaltrexamina al nacimiento (pero no a los 7 días de edad) produce una depresión del contenido de las proteínas de membrana encefálicas una semana más tarde, lo que sugiere que el uso de este compuesto en los recién nacidos produciría efectos que no parecen directamente relacionados con su capacidad de antagonizar el receptor  $\mu$ .
- 5.- El bloqueo funcional de los receptores opioides por naltrexona durante períodos críticos del desarrollo produce importantes modificaciones en los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico centrales, que dependen de la región encefálica estudiada y cuyas consecuencias se manifiestan también sobre dichos sistemas en el adulto.
- 6.- El sistema dopaminérgico en el cuerpo estriado parece ser más sensible al bloqueo opioide durante las dos primeras semanas postnatales, mientras que el sistema serotoninérgico, según lo observado en las regiones estudiadas (cuerpo estriado, mesencéfalo e hipotálamo) comienza a mostrar alteraciones debidas al tratamiento desde el día 14 y éstas continúan apareciendo hasta la edad adulta.
- 7.- El tratamiento subcrónico con naltrexona durante el período predestete incrementa los niveles de ansiedad/emotividad y disminuye las tendencias exploratorias en los animales adultos, sin que, aparentemente, se vea

modificada su actividad locomotora.

- 8.- Así, se podría afirmar que, durante el período neonatal, los opioides desempeñan un papel determinante en el desarrollo de los mecanismos neuroendocrinos que subyacen a las pautas de ansiedad/emotividad y exploración en el adulto.
- 9.- La adaptación de las condiciones de la prueba nociceptiva de inmersión de la cola en agua caliente para los animales neonatos resulta ser una modificación de gran utilidad que confiere una mayor eficacia a esta prueba en la valoración de los efectos de los distintos tratamientos durante el desarrollo, al tiempo que permite satisfacer mejor las consideraciones éticas relativas a la experimentación animal.
- 10.- La batería de medidas empleada para el seguimiento de las acciones de la naltrexona sobre diversos parámetros del desarrollo somático y neurobiológico postnatal parece ser adecuada para detectar incluso los efectos de pequeña magnitud debidos a este fármaco, por lo que podría representar un modelo válido en este campo para el control de las posibles alteraciones colaterales producidas por los compuestos de tipo opioide.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

ADAMS, J.V.; ANDREW, J.S.; HILLER, J.M.; SIMON, E.J.; HOLTZMAN, S.G. (1987)

Effects of stress and  $\beta$ -funaltrexamine pretreatment on morphine analgesia and opioid binding in rats. *Life Sci.* 41: 2835-2844.

ADER, R.; BEELS, C.C.; TATUM, R. (1960) Social factors affecting emotionality and resistance to disease in animals: II. Susceptibility to gastric ulceration as a function of interruptions in social interactions and the time at which they occur. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 53: 455-458.

ADLER, M.W. (1980) Minireview: opioid peptides. *Life Sci.* 26: 497-510.

AGRAWAL, H.C.; GLISSON, S.N.; HIMWICH, W.A. (1966) Changes in monoamines of rat brain during postnatal ontogeny. *Biochim. Biophys. Acta* 130: 511-513.

AKIL, H.; MAYER, D.J.; LIEBESKIND, J.C. (1976) Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science* 191: 961-962.

AKIL, H.; WATSON, S.; YOUNG, E.; LEWIS, E.; KHACHATURIAN, E.; WALKER, J.M. (1984) Endogenous opioids. Biology and function. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 223-255.

- ALBONETTI, M.E.; FARABOLLINI, F. (1992) Behavioural responses to single and repeated restraint in male and female rats. *Behav. Proc.* 28: 97-110.
- ALTMAN, J. (1972) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J. Comp. Neurobiol.* 145: 353-398.
- ALLEVA, E.; CAPRIOLI, A.; LAVIOLA, G. (1986) Postnatal social environment affects morphine analgesia in male mice. *Physiol. Behav.* 36: 779-781.
- ALLEVA, E.; CAPRIOLI, A.; LAVIOLA, G. (1989) Litter gender composition affects maternal behaviour of primiparous mouse dam (*Mus musculus*). *J. Comp. Physiol.* 103: 83-87.
- ANISMAN, H.; ZACHARKO, R.B. (1990) Multiple neurochemical and behavioral consequences of stressors: implications for depression. *Pharmac. Ther.* 46: 119-136.
- APFELBAUM, M.; MANDENOFF, A. (1981) Naltrexone suppresses hyperphagia induced in the rat by highly palatable diet. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15: 89-91.
- ARAHUETES, R.M.; CARRETERO, V.; DIEBOLD, Y.; RUA, C. (1991) Effects of maternal bilateral adrenalectomy and betamethasone administration on fetal rat

encephalic development. *Biol. Neonate* 59: 303-313.

ARCHER, J. (1975) Rodent sex differences in emotional and related behaviour. *Behav. Biol.* 14: 451-479.

ARDILA, R.; REZK, M.; POLANCO, R.; PEREIRA, F. (1977) Early handling, electric shock, and environmental complexity: effects on exploratory behavior, "emotionality", and body weight. *Psychol. Rec.* 27: 219-224.

ARJUNE, D.A.; STANDIFER, K.M.; PASTERNAK, G.W.; BODNAR, R.J. (1990) Reduction by central  $\beta$ -funaltrexamine of food intake in rats under freely-feeding, deprivation and glucoprivic conditions. *Brain Res.* 535: 101-109.

ARJUNE, D.; BOWEN, W.D.; BODNAR, R.J. (1991) Ingestive behavior following central [D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Cys<sup>6</sup>]-enkephalin (DALCE), a short-acting agonist and long-acting antagonist at the delta opioid receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39 (2) 429-36.

ARMARIO, A.; GIL, M.; MARTÍ, J.; POL, O.; BALASCH, J. (1991) Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39: 373-377.



ATTALI, B.; GOUARDERES, C.; MAZARGUIL, H.; AUDIGIER, Y.; CROS, J. (1982)

Evidence for multiple 'kappa' binding sites by use of opiod peptides in the guinea pig lumbo-sacral spinal cord. *Neuropeptides* 3: 53-59.

ATTALI, B.; SAYA, D.; VOGEL, Z. (1989)  $\kappa$ -Opiate agonists inhibit adenylate cyclase

and produce heterologus desensitization in the rat spinal cord. *J. Neurochem.* 52: 360-369.

BAILEY, C.C.; KITCHEN, I. (1987) Developmental responses to opioids reveals a lack

of effect on stress-induced corticosterone levels in neonatal rats. *Br. J. Pharmacol.* 91: 119-125.

BARDO, M.T.; BHATNAGAR, R.K.; GEBHART, G.F. (1981) Opiate receptor ontogeny

and morphine induced effects: influence of chronic footshock stress in preweanling rats. *Dev. Brain Res.* 1: 487-495.

BARDO, M.T.; BHATNAGAR, R.K.; GEBHART, G.F. (1982) Diferential effects of

chronic morphine and naloxone on opiate receptors, monoamines, and morphine-induced behaviors in preweanling rats. *Dev. Brain Res.* 4: 139-147.

BARDO, M.T.; BHATNAGAR, R.K.; GEBHART, G.F. (1983) Age-related differences in

the effect of chronic administration of naloxone on opiate binding in rat brain.

*Neuropharmacology* 22: 453-461.

BARDO, M.T.; NEISEWANDER, J.L.; PIERCE, R.C. (1989) Novelty-induced place preference behavior in rats: effects of opiate and dopaminergic drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32: 683-689.

BARON, S.A.; TESTA F.M; GINTZLER, A.R. (1985) Simultaneous quantitation of norepinephrine, dopamine and serotonin in brain during and following chronic naltrexone administration. *Brain Res.* 340: 192-198.

BARR, G.A.; PAREDES, W.; ERICKSON, K.L.; ZUKIN, R.S. (1986)  $\kappa$ -Opioid receptor mediated analgesia in the developing rat. *Dev. Brain Res.* 29: 145-152.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, L. (1984) Endogenous pain control system: brain spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 309-338.

BAYON, A.; SHOEMAKER, W.J.; BLOOM, F.E.; MAUSS, A.; GUILLEMIN, R. (1979) Perinatal development of the endorphin- and enkephalin- containing systems in the rat brain. *Brain Res.* 179: 93-101.

BEATTY, W.W. (1979) Gonadal hormones and sex differences in non-reproductive behaviors in rodents: organisational and activational influences. *Horm. Behav.* 12:

112-163.

BEATTY, W.W.; FESSLER, R.G. (1976) Ontogeny of sex differences in open-field behavior and sensitivity to electric shock in the rat. *Physiol. Behav.* 16: 413-417.

BECK, C.H.M., CHOW, H.L. (1984) Solitary and social behavior of male rats in the open field. *Physiol. Behav.* 32: 941-944.

BECKER, H.F. (1986) Comparison of the effects of the benzodiazepine midazolam and three serotonin agonists on a consummatory conflict paradigm. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1057-1064.

BEITZ, A.J. (1992) Anatomic and chemical organization of descending pain modulation systems. En *Animal Pain*, capítulo 2, págs. 31-62. (Editado por Short C.E. y Van Poznak A.), *Churchill Livingstone Inc.*, Nueva York, Edimburgo, Londres, Melbourne, Tokio, 587 págs.

BERNARDI, M.; GENEDANI, S.; BERTOLINI, A. (1986) Behavioral activity and active avoidance learning and retention in rats neonatally exposed to painful stimuli. *Physiol. Behav.* 36: 553-555.

- BICKNELL, R.J. (1985) Endogenous opioid peptides and the hypothalamic neuroendocrine neurones. *J. Endocr.* 107: 437-446.
- BLASS, E.M.; FITZGERALD, E. (1988) Milk-induced analgesia and comforting in 10-day-old rats: opioid mediation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29: 9-13.
- BLASS, E.M.; CRAMER, C.P.; FANSELOW, M.S. (1993) The development of morphine-induced antinociception in neonatal rats: a comparison of forepaw, hindpaw, and tail retraction from a thermal stimulus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44: 643-649.
- BLIZARD, D.; DENEFF, C. (1973) Neonatal androgen effects on open-field activity and sexual behavior in the female rat: the modifying influence of ovarian secretions during development. *Physiol. Behav.* 11: 65-69.
- BLIZARD, D.; LIPPMAN, H.R.; CHEN, J.J. (1975) Sex differences in open field behavior in the rat: the inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiol. Behav.* 14: 601-608.
- BODNAR, R.J.; ROMERO, M-T; KRAMER, E. (1988) Organismic Variables and Pain Inhibition: Roles of Gender and Aging. *Brain. Res. Bull.* 21: 947-953.

BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M.; KORTE, S.M. (1991) Psychosocial stress, anxiety and depression: physiological and neuroendocrine correlates in animal models. En *Stress and related disorders: from adaptation to dysfunction*, capítulo 16, págs. 129-138. (Editado por Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F., Martignoni E.). *The Parthenon Publishing Group*, Lancs, Nueva Jersey (Reino Unido, EE.UU.), 486 págs.

BOIVIN, A.; VENDRELY, R.; VENDRELY, C. (1948) L'acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire, dépositaire des caractères héréditaires; arguments d'ordre analytique. *Crit. Acad. Sci.* 226: 1061-1963.

BOWEN, W.D.; GENTELMAN, S.; HERKENBARN, M.; PERT, C.B. (1981) Interconverting mu and delta forms of the opiate receptors in rat striatal patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4818-4822.

BRADBURY, A.F.; SMYTH, D.G.; SNELL, C.R.; BIRDSALL, N.J.N.; HULME, E.C. (1976) C Fragment of lipoprotein has a high affinity for brain opiate receptors. *Nature* 260: 793-795.

BRADFORD, H.F. (1988) Fundamentos de Neuroquímica. *Editorial Labor*, Barcelona, 485 págs.

- BRAND, T.; SLOB, A.K. (1988) Peripubertal castration of male rats, adult open field ambulation and partner preference behavior. *Behav. Brain Res.* 30: 111-117.
- BROADHURST, P.L. (1957) Determinants of emotionality in the rat: I. Situational factors. *Br. J. Psychol.* 48: 1-12.
- BROADHURST, P.L. (1960) Applications of biometrical genetics to the inheritance of behaviour. En: *Experiments in Personality, vol. I. Psychogenetics and Psychopharmacology*, págs. 3-102. (Editado por Eyseck H.J.), *Routledge & Kegan Paul*, Londres, (Reino Unido).
- BROWN, D.R.; HOLTZMAN, S.G. (1979) Suppresion of deprivation-induced food and water intake in rats and mice by naloxone. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11: 567-573.
- BRUSH, F.R.; BARON, S.; FROEHLICH, J.C.; ISON, J.R.; PELLEGRINO, L.J.; PHILLIPS, D.S.; SAKELLARIS, P.C.; WILLIAMS, V.N. (1985) Genetic differences in avoidance learning by *Rattus norvegicus*: escape/avoidance responding, sensitivity to electric shock, discrimination learning, and open-field behavior. *J. Comp. Psychol.* 99 (1) 60-73.

CALENCO-CHOUKROUN, G.; DAUGÉ, V.; GACEL, G.; FÉRGER, J.; ROQUES, B.P.

(1991) Opioid  $\delta$  agonists and endogenous enkephalins induce different emotional reactivity than  $\mu$  agonists after injection in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology* 103: 493-502.

CARR, K.D.; BAK, T.H. (1988) Medial thalamic injection of opioid agonists:  $\mu$ -agonist increases while  $\kappa$ -agonist decreases stimulus thresholds for pain and reward. *Brain Res.* 441: 173-184.

CARRETERO, M.V. (1989) Papel de los esteroides adrenales maternos sobre el crecimiento y la proliferación celular de pulmón, hígado y cerebro fetales. *Tesis de Licenciatura*. Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal), Facultad de Biología, U.C.M., Madrid, 146 págs.

CARROL, M.N.; LIM, R.K.S. (1960) Observations on the neuropharmacology of morphine-like analgesia. *Arch. Intl. Pharmacodyn. Ther.* 125: 383-403.

CARUSO, T.P.; LARSON, D.L.; PORTOGHESE, P.S.; TAKEMORI, A.E. (1980) Pharmacological studies with alkylating narcotic agonist, chloroxymorphone, and antagonist, chlornaltrexamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213: 539-544.

- CIVELLI, O.; DOUGLAS, J.; HERBERT, E. (1984) Pro-opiomelanocortin: a polypeptide at the interface of the endocrine and nervous systems. En *The peptides* 6: 70-90. (Editado por Udenfriend S. y Meienhofer S.), *Academic Press*, Londres (Reino Unido).
- CLOUET, D.H.; RATNER, M. (1970) Catecholamine biosynthesis in brains of rats treated with morphine. *Science* 168: 854-856.
- COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. (1968) The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 32: 295-310.
- COOPER, S.J. (1980) Naloxone: effects on food and water consumption in the non-deprived and deprived rat. *Psychopharmacology* 71: 1-6.
- COOPER, S.J.; BARBER, D.J.; BARBOUR-McMULLEN, J. (1985a) Selective attenuation of sweetened milk consumption by opiate receptor antagonists in male and female rats of the Roman strains. *Neuropeptides* 5: 349-352.
- COOPER, S.J.; JACKSON, A.; MORGAN, R.; CARTER, R. (1985b) Evidence for opiate receptor involvement in the consumption of a high palatability diet in nondeprived rats. *Neuropeptides* 5: 345-349.



- COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. (1986) The biochemical basis of neuropharmacology (quinta edición). Oxford University Press, Nueva York, Oxford, 400 págs.
- COTTON, R.; GILES, M.G.; MILLER, L.; SHAW, J.S.; TIMMS, D. (1984) ICI 174,864: a highly selective antagonist for the opioid delta receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 97: 331-332.
- COX, B.M.; OPHEIM, K.; TESCHEMACHER, H.; GOLDSTEIN, A. (1975) A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. *Life Sci.* 16: 1777-1782.
- CROSS, M.S; LABARBA, R.C. (1978) Neonatal stimulation, maternal behavior, and accelerated maturation in BALB/c mice. *Dev. Psychobiol.* 11 (1) 83-92.
- D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. (1941) A method for determining of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 72: 74-79.
- DALSGAARD, C-J (1988) The sensory system. En *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 6: 599 (Editado por Björklund A., Hökfelt T., Owman C.), Elsevier Science Publishing, Amsterdam (Holanda).

- DAUGÉ, V.; KALIVAS, P.W.; DUFFY, T.; ROQUES, B.P. (1992) Effect of inhibiting enkephalin catabolism in the VTA on motor activity and extracellular dopamine. *Brain Res.* 599: 209-214.
- DE PEDRO, N; ALONSO-GÓMEZ, A.L.; GANCEDO, B.; DELGADO, M.J.; ALONSO-BEDATE, M. (1993) Feeding behavior responses to  $\beta$ -endorphin and galanin administration in goldfish (*Carassius auratus*) *EBBS conference* (enviado).
- DENENBERG, V.H. (1964) Critical periods, stimulus input and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychol. Rev.* 71: 335-357.
- DENENBERG, V.H.; ZARROW, M.X. (1971) Effects of handling in infancy upon adult behavior and adrenocortical activity: suggestions for a neuroendocrine mechanism. En: *Early childhood: the developing of a self-regulating mechanism*. (Editado por Walcher D.N. y Peters D.L.) *Academic Press*, Nueva York (EE.UU.) págs. 39-71.
- DEPAULIS, A.; MORGAN, M.M.; LIEBESKIND, J.C. (1985) GABAergic involvement in the antinociceptive effects of morphine at the level of the periaqueductal gray matter in the rat. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 28: 143.
- DESMOND, M.M.; WILSON, G.S. (1975) Neonatal abstinence syndrome: recognition and diagnosis. *Addict. Dis.* 2: 112-121.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. (1988) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244 (3) 1067-1080.

DORES, R.M.; STEVENSON, T.C.; JOSS, J.M.P. (1988) The isolation of multiple forms of  $\beta$ -endorphin from the Australian Lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Peptides* 9: 801-808.

DRAGO, F.; GENAZZANI, A.A.; (1991) Prolactin affects adaptation and dysfunction to stress in the rat. En *Stress and related disorders: from adaptation to dysfunction*, capítulo 18, págs. 151-156. (Editado por Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F., Martignoni E.). *The Parthenon Publishing Group*, Lancs, Nueva Jersey (Reino Unido, EE.UU.), 486 págs.

DRAGO, F.; PEDERSEN, C.A.; CALDWELL, J.D.; PRANGE, A.J. (1986) Oxytocin potently enhances novelty-induced grooming behavior in the rat. *Brain Res.* 368: 287-295.

DRAY, A.; PERKINS, M. (1993) Bradykinin and inflammatory pain. *TINS* 16 (3) 99-104.

DYER, E.D.; BICKNELL, R.J. (editores) (1989) Brain opioid system in reproduction. *Oxford Science Publications*, Oxford, Nueva York, Tokio, 365 págs.

- DYKSTRA, L. (1992) Dependence and opioid analgesia. *Behav. Pharmacol.* 3 (S1) 15.
- EDDY, N.B.; LEIBACH, D.J. (1953) Synthetic analgesics II. Diethienyl-butenyl and dithyenilbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107: 385-393.
- EMRICH, H.M.; SCHMAUSS, C. (1991) Psychiatric aspects of opioid research. En *Neurobiology of Opioids*, capítulo 22, págs. 363-367. (Editado por Almeida O.F.X. y Shippenberg T.S.), Springer-Verlag. Berlín Heidelberg Nueva York, 456 págs.
- ENESCO, M.; LEBLOND, C.P. (1957) Increase in cell number as a factor in the growth of the organs of the young male rat. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- ENTERS, E.K.; SPEAR, L.P. (1988) Serotonergic and opiate interactions in the modulation of drug- and environmental-induced analgesia in the neonatal rat pup. *Behav. Neural Biol.* 50: 80-97.
- FANSELOW, M.S.; BOLLES, R.C. (1979) Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93 (4) 736-744.
- FARABOLLINI, F.; FILE, S.E.; JHONSTON, A.L.; WILSON, C.A. (1987) An analysis of sex differences in the open field and tests of exploration and anxiety. *Br. J.*

*Pharmacol.* 90: 263P.

FARABOLLINI, F.; HOLE, D.R.; WILSON, C.A. (1988) Behavioral effects in adulthood of serotonin depletion by p-chlorophenylalanine given neonatally to male rats. *Int. J. Neurosci.* 41: 187-199.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES, J.A. (editor) (1989) Fisiología Endocrina. *EUDEMA S.A.* Madrid, 655 págs.

FERREIRA, S.H.; MOLINA, N., VETTORE, O. (1982) Prostaglandin hyperalgesia V: a peripheral analgesic receptor for opiates. *Prostaglandins* 23: 53-60.

FILE, S.E. (1978a) Exploration, distraction, and habituation in rats reared in isolation. *Dev. Psychobiol.* 11 (1) 73-81.

FILE, S.E. (1978b) The ontogeny of exploration in the rat: habituation and effects of handling. *Dev. Psychobiol.* 11 (4) 321-328.

FILE, S.E. (1990) One trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology (Berlin)* 100: 281-282.

- FILE, S.E.; WARDILL, A.G. (1975) Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia (Berlin)* 44: 53-59.
- FILE, S.E; ZANGROSSI, H.; ANDREWS, N. (1993) Social interaction and elevated plus-maze tests: changes in release and uptake of 5-HT and GABA. *Neuropharmacology*, 32: 217-221.
- FINNERTY, E.P.; CHAN, S.H.H. (1981) The participation of substantia nigra compacta and zona reticulata neurons in morphine suppression of caudate spontaneous neuronal activities in the rat. *Neuropharmacology* 20: 241-246.
- FONTANI, G.; VERGNANI, L.; SALVADORI, S.; VOGLINO, N.; ALOISI, A.M.; PORTALUPPI, F.; DEGLI UBERTI, E.C. (1993) Effect of deltorphin on behavior and hippocampal electrical activity in rabbits. *Physiol. Behav.* 53: 285-29.
- FORMAN, L.J.; CAVALIERI, T.; ESTILOW, S.; TATARIAN, G.T. (1990) The elevation of immunoreactive beta-endorphin in old male rats is related to alterations in dopamine and serotonin. *Neurobiol. Aging* 11: 223-227.
- FRENK, H.; ROGERS, G.H. (1979) The suppressant effect of naloxone on food and water intake in the rat. *Behav. Neural Biol.* 26: 23-40.

FUKUDA, T.; YAMADA, K.; SUENAGA, N.; TAKISHITA, S. (1977) Changes in spontaneous activity and emotional responses of rats treated with 6-hydroxydopamine at the suckling age. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 230: 100-111.

FULLER, R.W. (1984) Serotonin receptors. *Monogr. Neural Sci.* 10: 158-181.

GALL, C. (1984) Ontogeny of dynorphin-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the rat. *Brain Res.* 307: 327-331.

GANONG W.F. (1989) Review of Medical Physiology. *Prentice-Hall International Inc.*, 14ª edición, East Norwalk (EE.UU.), 673 págs.

GARCÍA-MÁRQUEZ, C.; ARMARIO, A. (1987) Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiol. Behav.* 40: 33-38.

GERVAIS, M.C. (1978) Social and genotypic aspects of open-field behavior of two lines of mice: a follow up. *Behav. Biol.* 22: 388-392.

GIARDINO, L.; CALZA, L.; MONTANINI, V.; VELARDO, A.; BARAGHINI, G.F.; BATTISTINI, N.; MARRAMA P., TIENGO, M. (1990) Functional plasticity of opioid peptides. *Advances in Pain Research and Therapy*, 14: 87-106. (Editado por

C. Benedetti y col.) *Raven Press Ltd.*, Nueva York (EE.UU.)

GIL, M.; MARTÍ, J.; ARMARIO, A. (1992) Inhibition of catecholamine synthesis depresses behavior of rats in the holeboard and forced swim tests: influence of previous chronic stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43: 597-601.

GILLAN, M.G.C.; KOSTERLITZ H.W. (1982) Spectrum of the  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -binding sites in homogenates of rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 77: 471.

GLADUE, B.A.; HUMPHRYS, R.R.; DEBOLD J.F.; CLEMENS, L.G. (1977) Ontogeny of biogenic amine systems and modification of indole levels upon adult sexual behaviour in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 7: 253-258.

GLOWINSKI, J.; IVERSEN, L.L. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The disposition of [ $^3$ H]norepinephrine, [ $^3$ H]dopamine and [ $^3$ H]dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13: 655-669.

GOICOECHEA, C. (1991) Efecto analgésico de la calcitonina: posible relación con el sistema opioide. *Tesis de Licenciatura*. Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal), Facultad de Biología, U.C.M., Madrid, 73 págs.



- GOLDSTEIN, A.; LOWNEY, L.I.; PAL, B.K. (1971) Stereospecific and nonspecific interactions of morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1742-1747.
- GOLDSTEIN, A. (1984) Biology and chemistry of the dynorphin peptides. En *The peptides* 6: 95-145. (Editado por Udenfriend S. y Meienhofer S.), *Academic Press*, Londres (Reino Unido).
- GOLEMBIOWSKA-NIKITIN, K.; WISZNIOWSKA, G.; MAHARAJ, J. (1977) The effect of serotonin receptor blocking agents -cyproheptidine and danitracen- on the serotonin turnover in the rat brain. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 29: 485-495.
- GONZÁLEZ, M.I. (1991) Diferenciación sexual y monoaminas cerebrales. *Editorial de la Universidad Complutense de Madrid*. Madrid, 242 págs.
- GONZÁLEZ, M.I.; LERET, M.L. (1992) Neonatal catecholaminergic influence on behaviour and sexual hormones. *Physiol. Behav.* 51: 527-531.
- GOODMAN, R.R.; SNYDER, S.H.; KUCHAR, M.S.; YOUNG, W.S. (1980) Differentiation of delta and mu opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6239-6243.

GRAEFF, F.G.; AUDI, E.A.; ALMEIDA, S.S.; GRAEFF, E.O.; HUNZIKER, M.H.L.

(1990) Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. *Neurosci. Behav. Rev.* 14: 501-506.

GRAUER, S.M.; TAO, R.; AUERBACH, S.B. (1992) Morphine induces an increase in extracellular serotonin in rat diencephalon. *Brain Res.* 599: 277-282.

GRAY, J.A. (1965) A time-sample study of the components of general activity in selected strains of rats. *Canad. J. Psychol.* 19: 74-82.

GRAY, J.A. (1971a) La psicología del miedo. Biblioteca para el hombre actual, 68. *Ediciones Guadarrama S.A.*, Madrid, 225 págs.

GRAY, J.A. (1971b) Sex differences in emotional behaviour in mammals including man: endocrine bases. *Acta Psychol.* 35: 29-46.

GRAY, J.A. (1979a) Comment on Archer's paper: "sex differences in the emotional behaviour of laboratory mice". *Br. J. Psychol.* 70: 35.

GRAY, J.A. (1979b) Emotionality in male and female rodents: a reply to Archer. *Br. J. Psychol.* 70: 425-440.

- GRAY, J.A. (1991) (reimpresión corregida de la 2ª ed. 1987) The psychology of fear and stress. Problems in the Behavioural Sciences, 5. *Cambridge University Press*, Cambridge (Reino Unido), 422 págs.
- GRAY, J.A.; LAJLLEE, B. (1974) Sex differences in emotional behaviour in the rat: correlation: correlation between open-field defecation and active avoidance. *Anim. Behav.* 22: 856-861.
- GRAY, J.A.; LEVINE, S.; BROADHURST, P.L. (1965) Gonadal hormone injections in infancy and adult emotional behaviour. *Anim. Behav.* 13 (1) 33-45.
- GRAY, J.A.; LEAN, J.; KEYNESS, A. (1969) Infant androgen treatment and adult open-field behaviour: direct effects and effects of injections to siblings. *Physiol. Behav.* 4: 177-181.
- GRAY, J.A.; DREWETT, R.F.; LAJLLEE, B. (1975) Effects of neonatal castration and testosterone injection on adult open-field behaviour in rats with atypical sex difference in defecation. *Anim. Behav.* 23: 773-778.
- GREEN, E.J.; ISAACSON, R.L.; DUNN, A.J.; LANTHORN, T.H. (1979) Naloxone and haloperidol reduce grooming occurring as an aftereffect of novelty. *Behav. Neural. Biol.* 27: 546-551.

GUDELSKY, G.A.; PORTER, J.C. (1979) Morphine- and peptide-induced inhibition of the release of dopamine from tuberoinfundibular neurons. *Life Sci.* 25: 1697-1702.

GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. (1991) Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 103: 91-94.

HAMMER, R.P. (1985) Ontogeny of opiate receptors in the rat medial preoptic area: critical periods in regional development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 3: 541-548.

HAMMER, R.P.; RICALDE, A.A.; SEATRIZ, J.V. (1989) Effects of opiates on brain development. *Neurotoxicology* 10: 475-484.

HAMMONDS, R.A.; NICOLAS, P.; LI, C.H. (1982) Beta-endorphin: analgesic and receptor binding activity of non-mammalian homologs. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 19 (5) 556-561.

HARDIN, C.M. (1973a) Sex differences in serotonin synthesis from 5-hydroxytryptophan in neonatal rat brain. *Brain Res.* 59: 437-439.

HARDIN, C.M. (1973b) Sex differences and the effects of testosterone injections on biogenic amine levels of neonatal rat brain. *Brain Res.* 62: 286-290.

- HARRY, G.J.; ROSECRANS, J.A. (1979) Behavioral effects of perinatal naltrexone exposure: a preliminary investigation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11 (suplem.) 19-22.
- HAUSER, K.F.; McLAUGHLIN, P.J.; ZAGON, I.S. (1987) Endogenous opioids regulate dendritic growth and spine formation in developing rat brain. *Brain Res.* 416: 157-161.
- HAUSER, K.F.; McLAUGHLIN, P.J.; ZAGON, I.S. (1989) Endogenous opioids systems and the regulation of dendritic growth and spine formation. *J. Comp. Neurol.* 281: 13-22.
- HAYES, A.G.; SHEEHAN, M.J.; TYERS, M.B. (1985) Determination of the receptor selectivity at opioid agonists in the guinea pig ileum and mouse vas deferens by use of  $\beta$ -funaltrexamine. *Br. J. Pharmacol.* 86: 899-904.
- HAYES, A.G.; SKINGLE, M.; TYERS, M.B. (1986) Reversal of  $\beta$ -funaltrexamine of antinociceptive effects of opioid agonists in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 88: 867-872.
- HERBERT, E.; CIVELLI, O.; DOUGLAS, J.; MARTENS, G.; ROSEN, H. (1985) Generation of diversity of peptides. En *Biochemical actions of hormones* 12: 1-36. (Editado por Litwack G.), *Academic Press*, Nueva York, Londres.

- HERMAN, B.H.; PANKSEPP J. (1978) Effects of morphine and naloxone on separation distress and approach attachment: evidence for opiate mediation of social affect. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9: 213-220.
- HERNÁNDEZ, R. (1984) Conducta general y testosteronemia en la rata: un modelo de comportamiento basado en esta relación. *Editorial de la Universidad Complutense de Madrid*, Madrid, 242 págs.
- HILL, H.F.; WATANABE, Y.; SHIBUYA, T. (1984) Differential postnatal ontogeny of opiate and benzodiazepine receptor subtypes in the rat cerebral cortex: binding characteristics of tipladom and brotizolam. *Jpn. J. Pharmacol.* 36: 15-21.
- HOEHE, M.; DUKA, T. (1993) Opiates increase plasma catecholamines in humans. *Psychoneuroendocrinology* 18 (2) 141-148.
- HOFER, M.A. (1975) Studies on how early maternal separation produces behavioral change in young rats. *Psychosom. Med.* 37 (3) 245-264.
- HOLADAY, J.W.; TORTELLA, F.C.; MANECKJEE, R.; LONG, J.B. (1986) *In vivo* interaction among opiate receptor agonists and antagonists. En *NIDA monograph: opiate receptor subtypes and brain function*, págs. 173-188 (Editado por Brown RM, Clouet D.H., Friedman, D.P.). *National Institute of Drug Abuse*, Rockville

(EE.UU.)

HOLLISTER, L.E.; JOHNSON, K.; BOUKHABZA, D.; GILLESPIE, H.K. (1981)

Aversive effects of naltrexone in subjects not dependent on opiates. *Drug Alcohol Depend.* 7: 1-5.

HÖLLT, V. (1986) Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Ann. Rev.*

*Pharmacol. Toxicol.* 26: 59-77.

HÖLLT, V. (1991) Opioid peptide genes: structure and regulation. En *Neurobiology of*

*Opioids*, capítulo 2, págs. 11-51. (Editado por Almeida O.F.X. y Shippenberg T.S.), Springer-Verlag. Berlín Heidelberg Nueva York, 456 págs.

HOMMER, D.W.; PERT, A. (1983) The actions of opiates in the rat substantia nigra: an

electrophysiological analysis. *Peptides* 4: 603-607.

HOSKINS, B.; BURTON, C.K.; HO, I.K. (1986) Differences in morphine-induced

antinociception and locomotor activity in mature adult and aged mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25: 599-605.

HUGHES, J. (1975) Isolation of an endogenous compound from the brain with

pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88: 295-308.

HUGHES, R.A. (1990a) Strain-dependent morphine-induced analgesic and hyperalgesic effects on thermal nociception in domestic fowl (*Gallus gallus*). *Behav. Neurosci.* 104 (4) 619-624.

HUGHES, R.A. (1990b) Codeine analgesic and morphine hyperalgesic effects on thermal nociception in domestic fowl. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35 (3) 567-570.

HUGHES, J.; SMITH, T.W.; KOSTERLITZ, H.W.; FOTHERGILL, L.A.; MORGAN, B.A.; MORRIS, H.R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579.

IFFA-CREDO (1992) Animaux de laboratoire. *IFFA-CREDO*, Les Oncins (Francia), 140 págs.

IGGO, A.; IVERSEN, L.L.; CERVERO, F. (edited by) (1985). A discussion of nociception and pain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol)* 308: 219-431.

ILLERA, M.; ILLERA, J.C.; ILLERA, M.J. (1991) El ratón y la rata. Serie: Animales de experimentación. *Editorial Complutense*, Madrid, 127 págs.

ILLES, P.; JACKISCH, R. (1991) Modulation of catecholamine release in the central nervous system by multiple opioid receptors. En *Neurobiology of Opioids*, capítulo



13, págs. 213-225. (Editado por Almeida O.F.X. y Shippenberg T.S.), *Springer-Verlag*. Berlín Heidelberg Nueva York, 456 págs.

INY, L.J.; GIANOULAKIS, C.; PALMOUR, R.M.; MEANEY, M.J. (1987) The  $\beta$ -endorphin response to stress during postnatal development in the rat. *Dev. Brain Res.* 31: 177-181.

ISAYAMA, T.; McLAUGHLIN, P.J.; ZAGON, I.S. (1991) Endogenous opioids regulate cell proliferation in the retina of developing rat. *Brain Res.* 544: 79-85.

IZQUIERDO, I.; BARCIK, N.R.; BRIONI, J.D. (1989) Pretest beta-endorphin and epinephrine, but not oxotremorine, reverse retrograde interference of a conditioned emotional response in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33 (3) 545-548.

JACOBSON, M. (1978) *Developmental Neurobiology*, págs. 61-67. *Plenum*, Nueva York (EE.UU.)

JANSSEN, P.A.J.; NIEMEGBERS, C.J.E.; DONY, J.G.H. (1963) The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm induced tail withdrawal reflex. *Arzneim. Forsch.* 13: 502-504.

JAW, S.P.; HOSKINS, B.; HO, I.K. (1993) Opioid antagonists and butorphanol

dependence. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44: 497-500.

JHAMANDAS, K.; MARIEN, M. (1987) Glutamate-evoked release of endogenous brain dopamine: inhibition by excitatory amino acid antagonist and an enkephalin analogue. *Br. J. Pharmacol.* 90: 641-650.

JOHNSTON, A.L.; FILE, S.E. (1991) Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.* 49: 245-250.

JORDAN, C.C.; OEHME, P. (1985) Substance P metabolism and biological actions. *Taylor & Francis Ltd.*, Londres, Philadelphia, 260 págs.

JURNA, I. (1981) Changes in the activity of nigral neurones induced by morphine and other opiates in rats with intact brain and after prenigral decerebration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316: 149-154.

KAMATA, K. (1987) Pharmacological studies on the interrelation between the dopaminergic, GABAergic and opioid peptidergic systems in the central nervous system of the rat. *Japan. J. Pharmacol.* 45: 439-447.

KAPCALA, L.P. (1983) Discordant changes in immunoreactive ACTH and  $\beta$ -endorphin in rat brain and pituitary during development. *Clin Res.* 31: 401.

- KARKI, N.; KUNTZMAN, R.; BRODIE, B.B. (1962) Storage, synthesis, and metabolism of monoamines in the developing brain. *J. Neurochem.* 9: 53-58.
- KAPCALA, L.P. (1986) Discordant changes between immunoreactive ACTH and  $\beta$ -endorphin in rat brain and pituitary during early development. *Brain Res.* 364: 350-359.
- KASTIN, A.; KOSTRZEWA, R.M.; SCHALLY, A.V.; COY, D.H. (1980) Neonatal administration of met-enkephalin facilitates maze performance of adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13: 883-886.
- KATOH, A.; NABESHIMA, T.; KAMEYAMA, T. (1990) Behavioural changes induced by stressful situations: effects of enkephalins, dynorphin, and their interactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253 (2) 600-607.
- KAVALIERS, M.; HIRST, M. (1987) Slugs and snails and opiate tales: opioids and feedings behavior in invertebrates. *Fed. Proc.* 46 (1) 168-172.
- KEHOE, P.; BLASS, E.M. (1986a) Behaviorally functional opioid system in infant rats: I. Evidence for olfactory and gustatory classical conditioning. *Behav. Neurosci.* 100 (3) 359-367.

- KEHOE, P.; BLASS E.M. (1986b) Opioid mediation of separation distress in 10-day-old rats: reversal of stress with maternal stimuli. *Dev. Psychobiol.* 19 (4) 385-398.
- KELLER, H.H.; BARTHOLINI, G.; PLETSCHER, A. (1973) Spontaneous and drug-induced changes of cerebral dopamine turnover during postnatal development of rats. *Brain Res.* 64: 371-378.
- KELLOGG, C.K. (1992) Benzodiazepines and the developing nervous system: laboratory findings and clinical implications. En *Maternal substance abuse and the developing nervous system*, capítulo 12, págs. 283-321. (Editado por Zagon I.S. y Slotkin T.A), *Accademic Press, Inc*, San Diego (EE.UU.), 377 págs.
- KELLY, P.H.; SEVIOUR, P.V.; IVERSEN, S.D. (1975) Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res.* 94: 507.
- KIM, H.S.; IYENGAR, S.; WOOD, P.L. (1986) Opiate actions on mesocortical metabolism in the rat. *Life Sci.* 39: 2033-2036.
- KIMURA, T.; KATOH, M.; SATOH, S. (1988) Inhibition by opioid agonists and enhancement by antagonists of the release of catecholamines from the dog adrenal gland in response to splachnic nerve stimulation: evidence for the functional role

of opioid receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224 (3) 1098-1102.

KIRBY, M.L.; MATTIO, T.G. (1982) Developmental changes in serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations and opiate receptor binding in rat spinal cord following neonatal 5,7-dihydroxytryptamine treatment. *Dev. Neurosci.* 5: 394-402.

KITCHEN, I. (1984) Modification of an analgesy meter for paw-pressure antinociceptive testing in neonatal rats. *J. Pharmacol. Meth.* 12: 255-258.

KITCHEN, I.; PINKER, S.R. (1990) Antagonism of swim-stress-induced antinociception by the delta opioid receptor antagonist naltrindole in adult and young rats. *Br. J. Pharmacol.* 100: 685-688.

KITCHEN, I.; McDOWELL, J.; WINDER, C.; WILSON, J.M. (1984) Low level lead exposure alters morphine antinociception in neonatal rats. *Toxicol. Lett.* 22: 119-123.

KITCHEN, I.; KELLY, M.; VIVEROS, M.P. (1990) Ontogenesis of  $\kappa$  opioid receptors in rat brain using [ $^3$ H] U69593 as a binding ligand. *Eur. J. Pharmacol.* 175: 93-96.

- KMIECIAK-KOLADA, K.; KOWALSKI, J. (1986) Involvement of the central serotonergic system in the changes of leu-enkephalin level in discrete rat brain areas. *Neuropeptides* 7: 351-360.
- KORNBLUM, H.I.; LOUGHLIN, S.E.; LESLIE, F.M. (1987) Effects of morphine on DNA synthesis in neonatal rat brain. *Dev. Brain Res.* 31: 45-52.
- KOVÁCS, G.L.; DE WIED D. (1978) Effects of amphetamine and haloperidol on avoidance behavior and exploratory activity. *Eur. J. Pharmacol.* 53: 103-107.
- KRUK, Z.L.; PYCOCK, C.J. (1991) Neurotransmitters and drugs (tercera edición). *Chapman & Hall*, Londres, Nueva York, Tokio, Melbourne, Madrás, 204 págs.
- KSHAMA, D.; HRISHIKESHAVAN, H.J.; SHANBHOGUE, R.; MUNONYEDI, U.S. (1990) Modulación of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. *Behav. Neur. Biol.* 54: 234-253.
- KURAISHI, Y.; HIROTA, N.; SATO, Y.; HINO, Y.; SATOH, M.; TAKAGI, H. (1985) Evidence that substance P and somatostatin transmit separate information related to pain in the dorsal horn. *Brain Res.* 325: 294-298.

LADOWSKY, W.; GAZIRI, L.C.J. (1970) Brain serotonin and sexual differences of the nervous system. *Neuroendocrinology* 6: 168-174.

LAHTI, R.A.; COLLINS, R.J. (1978) Chronic naloxone results in prolonged increases in opiate binding sites in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 51: 185-186.

LAVIN, A.; GARCÍA-MUÑOZ, M. (1985) Electrophysiological changes in substantia nigra after dynorphin administration. *Brain Res.* 369: 298-302.

LAVIOLA, G.; LOGGI, G. (1992) Sexual segregation in infancy and bi-directional benzodiazepine effects on hot-plate response and neophobia in adult mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42: 865-870.

LEADEM, C.A.; CROWLEY, W.R.; SIMPKINS, J.W.; KALRA, S.P. (1985) Effects of naloxone on catecholamine and LHRH release from the perfused hypothalamus of the steroid primed rat. *Neuroendocrinology* 40: 497-500.

LEE, R.L.; SEWELL, R.D.E.; SPENCER, P.S.J. (1978) Importance of 5-hydroxytryptamine in the antinociceptive activity of the leucine-enkephalin derivative, D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin (BW180C), in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 47: 251-253.

LEIBOWITZ, S. (1990) The role of serotonin in eating disorders. *Drugs* 39 (S3) 33-48.

LEVINE, S. (1962) The psychophysiological effect of infantile stimulation. En: *Roots of Behavior* (Editado por Bliss, E.) págs. 246-253. *Paul Hoeber, Inc.*, Nueva York (EE.UU.).

LEVINE, S.; CHEVALIER, J.A.; KORCHIN, S.J. (1956) The effects of shock and handling in infancy on later avoidance learning. *J. Pers.* 24: 477-492.

LEVINE, S.; HALTMEYER, G.C.; KARAS, G.; DENENBERG, V.H. (1967) Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol. Behav.* 2: 55-59.

LEVINE, A.S.; MORLEY, J.E.; GOSNELL, B.A.; BILLINGTON, C.J.; BARTNESS, T.J. (1985) Opioids and consummatory behavior. *Brain Res. Bull.* 14: 663-672.

LEVINE, A.S.; GRACE, M.; BILLINTON, C.J. (1991a) Beta-funaltrexamine (Beta-FNA) decreases deprivation and opioid induced feeding. *Brain Res.* 562 (2) 281-284.

LEVINE, S.; CHAMPOUX, M.; WIENER, S.G. (1991b) Social modulation of the stress response. En *Stress and related disorders: from adaptation to dysfunction*, capítulo 15, págs. 121-128. (Editado por Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F., Martignoni



E.). *The Parthenon Publishing Group*, Lancs, Nueva Jersey (Reino Unido, EE.UU.), 486 págs.

LEWIS, J.W. (1986) Multiple neurochemical and hormonal mechanisms of stress-induced analgesia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 467: 194-204.

LEWIS, J.W.; CANNON, J.T.; LIEBESKIND, J.C. (1980) Opioid and nonopioid mechanism of stress analgesia. *Science* 208: 623-625.

LEWIS, J.W.; TORDOFF, M.G.; SHERMAN, J.E.; LIEBESKIND, J.C. (1982). Adrenal medullary enkephalin-like peptides may mediate opioid stress analgesia. *Science* 217: 557-559.

LEWIS, M.E.; KHACHATURIAN, H.; WATSON, S.J. (1983a) Comparative distribution of opiate receptors and the three opioid peptide neuronal systems in rhesus monkey central nervous system. *Life Sci.* 33: 239-242.

LEWIS, M.E.; PERT, A.; PERT, C.B.; HERKENHAM, M. (1983b) Opiate receptor localization in rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 216: 339-358.

LI, C.H.; CHUNG, D. (1976) Isolation and structure of a triakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1145-1148.

- LIDOV, H.G.W.; MOLLIVER, M.E. (1982a) An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain. Res. Bull.* 8: 389-430.
- LIDOV, H.G.W.; MOLLIVER, M.E. (1982b) An immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain. Res. Bull.* 9: 559-604.
- LIGHTMAN, S.L.; YOUNG, W.S. (1987) Changes in hypothalamic preproenkephalin A mRNA following stress and opiate withdrawal. *Nature* 328: 643-645.
- LIMONTA, P.; DONDI, D.; MAGGI, R.; PIVA, F. (1991) Testosterone and postnatal ontogenesis of hypothalamic mu ( $[^3\text{H}]$  dihydromorphine) opioid receptors in the rat. *Dev. Brain Res.* 62: 131-136.
- LISTER, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92: 180-185.
- LOIZOU, L.A.; SALT, P. (1970) Regional changes in monoamines of the rat brain during postnatal development. *Brain Res.* 20: 467-470.
- LÓPEZ, F. (1991) Prevención y signos de tolerancia y abstinencia opiode por clonidina, nimodipino y diltiazem. *Tesis Doctoral*. Departamento de Biología Animal II

(Fisiología Animal), Facultad de Biología, U.C.M., Madrid, 221 págs.

LORD, J.A.H.; WATERFIELD, A.A.; HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H.W. (1977)

Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499.

LOUGHLIN, S.E.; MASSAMIRI, T.R.; KORNBLUM, H.I.; LESLIE, F.M. (1985)

Postnatal development of opioid systems in rat brain. *Neuropeptides* 5: 469-472.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951) Protein

measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.

MACKAY-SIM, A.; LAING, D.G. (1981) The sources of odors from stressed rats. *Physiol.*

*Behav.* 27: 511-513.

MANSOUR, A.; KHACHATURIAN, H.; LEWIS, M.E.; AKIL, H.; WATSON, S.J. (1988)

Anatomy of CNS opioid receptors. *TINS* 11: 308-314.

MANSOUR, A.; SCHAFFER, M. K-H; NEWMAN, S.W.; WATSON, S.J. (1991) Central

distribution of opioid receptors: a cross-species comparison of the multiple opioid system of the basal ganglia. En *Neurobiology of Opioids*, capítulo 10, págs. 169-183. (Editado por Almeida O.F.X. y Shippenberg T.S.), *Springer-Verlag*. Berlín Heidelberg Nueva York, 456 págs.

MARTIN, W.R.; EADES, C.G.; THOMPSON, J.A.; HUPPLER, R.F.; GILBERT, P.E.

(1976) The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197: 517-522.

MASEDA, C.; AGUADO, E.G.; MENA, M.A.; DE YEVENES, J.G. (1983) Ontogenetic development of  $\beta$ -endorphin immunoreactivity in rat brain regions. *Neurosci. Lett. Suppl.* 14: S237.

MAYER, D.J. (1979) Endogenous analgesia systems: neural and behavioural mechanisms.

En *Advances in Pain Research and Therapy*, 3: 385-410. (Editado por Bonica J.J.

y Albe-Fessard D.) *Raven Press Ltd.*, Nueva York (EE.UU.)

MAYER, D.J.; PRICE, D.D. (1976) Central nervous system mechanisms of analgesia. *Pain*

2: 379-404.

MAYER, D.J.; WOLFE, T.L.; AKIL, H.; CARDER, B.; LIEBESKIND, J.C. (1971)

Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science* 174: 1351-1354.

McCARTY, R.; HORBALY, W.G.; BROWN, M.S.; BAUCOM, K. (1981) Effects of

handling during infancy on the sympathetic-adrenal medullary system of rats. *Dev.*

*Psychobiol.* 14 (6) 533-539.

McDOWELL, J.; KITCHEN, I. (1987) Development of opioid systems: peptides, receptors and pharmacology. *Brain. Res. Rew.* 12: 397-421.

McKNIGHT, A.T; REES, D. (1991) Opioid receptors and their ligands. *Neurotransmissions* 7 (2) 1-8.

MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; BODNOFF, S.R.; INY, L.J.; SAPOLSKY, R.M. (1985) The effects of postnatal handling on the development of the glucocorticoid receptor systems and stress recovery in the rat. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 9: 731-734.

MEERT, T.F.; COLPAERT, F.C. (1986) The shock probe conflict procedure. A new assay responsive to benzodiazepines, barbiturates and related compounds. *Psychopharmacology* 88: 445-450.

MEYERSON, B.J.; BERG, M.; JOHANSSON, B. (1988) Neonatal naltrexone treatment: effects on sexual and exploratory behavior in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31: 63-67.

MICKLEY, G.A.; MULVIHILL, M.A.; POSTLER, M.A. (1990) Brain  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors mediate different locomotor hyperactivity responses of the C57BL/6J mouse. *Psychopharmacology* 101: 332-337.

- MILLAN, M.J. (1986) Multiple opioid system and pain. *Pain* 27: 303-347.
- MILLAN, M.J. (1989)  $\kappa$ -Opioid receptor-mediated antinociception in the rat. I. Comparative actions of  $\mu$ - and  $\kappa$ -opioids against noxious thermal, pressure and electrical stimuli. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 334-341.
- MILLAN, M.J. (1990)  $\kappa$ -Opioid receptors and analgesia. *TPS* 11: 70-75.
- MILLAN, M.J.; CZLONKOWSKI, A.; MILLAN, M.H.; HERZ, A. (1987) Activation of periaqueductal grey pools of  $\beta$ -endorphin by analgesic electrical stimulation of the freely moving rat. *Brain Res.* 407: 199-203.
- MILLAN, M.J.; CZLONKOWSKI, A.; LIPKOWSKI, A.; HERZ, A. (1989)  $\kappa$ -Opioid receptor-mediated antinociception in the rat. II. Supraspinal in addition to spinal sites of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 342-350.
- MILLAN, M.J.; WEIHE, E.; CZLONKOWSKI, A.C. (1991) Endogenous opioid systems in the Control of pain. En *Neurobiology of Opioids*, capítulo 15, págs. 246-260. (Editado por Almeida O.F.X. y Shippenberg T.S.), Springer-Verlag. Berlín Heidelberg Nueva York, 456 págs.

MIRSKY, A.F.; RIS, H. (1949) Variable and constant components of chromosomes.

*Nature* 163: 666-667.

MONTERO, M.T.; GUILLAMÓN, A.; AZUARA, M.C.; AMBROSIO, E.; SEGOVIA, S.;

ORENSANZ L.M. (1983) Sex differences in the protein content of membrane fractions from several regions of the rat central nervous system. *IRCS Medical Science: Biochemistry; Cell and Membrane Biology; Endocrine System; Nervous System; Physiology; Reproduction, Obstetrics and Gynecology*. 11: 317.

MONTGOMERY, K.C. (1958) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48: 254-260.

MOORE, C.L. (1986a) A hormonal basis for sex differences in self-grooming of rats.

*Horm. Behav.* 12: 112-163.

MOORE, C.L. (1986b) Sex differences in self-grooming of rats: effects of gonadal hormones and context. *Physiol. Behav.* 36: 451-455.

MOORE, C.L.; MORELLI, G.A. (1979) Mother rats interact differently with male and female offspring. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93: 677-684.

- MOREAU, J.L.; FIELDS, H.L. (1986) Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons to modulate nociceptive transmission. *Brain Res.* 397: 37.
- MORELAND, T.A.; BRICE, J.E.H.; WALKER, C.H.M.; PARIJA, A.C. (1980) Naloxone pharmacokinetics in the newborn. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 9: 609-612.
- MORELLI, M.; FENU, S.; DI CHIARA, G. (1989) Substantia nigra as a site of origin of dopamine-dependent motor syndromes induced by stimulation of mu and delta opioid receptors. *Brain Res.* 487 (1) 120-130.
- MORLEY, J.E. (1991) Stress and ingestive disorders. En *Stress and related disorders: from adaptation to dysfunction*, capítulo 12, págs. 103-108. (Editado por Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F., Martignoni E.). *The Parthenon Publishing Group*, Lancs, Nueva Jersey (Reino Unido, EE.UU.), 486 págs.
- MORLEY, J.E.; LEVINE, A.S.; YIM, G.K.W.; LOWY, M.T. (1983) Opioid modulation of appetite. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 7: 281-305.
- MORRIS, B.J. (1991) Modulation of central opioid receptors. En *Neurobiology of Opioids*, capítulo 11, págs. 185-197. (Editado por Almeida O.F.X. y Shippenberg T.S.), *Springer-Verlag*. Berlín Heidelberg Nueva York, 456 págs.



- MORRIS, M.D.; GEBHART, G.F. (1978) The effect of morphine on fear and extinction in rats. *Psychopharmacology* 57: 267-271.
- MORRIS, B.J.; HÖLLT, V.; HERZ, A. (1988) Opioid gene expression in rat striatum is modulated via opioid receptors: evidence from localized receptor inactivation. *Neurosci. Lett.* 89: 80-84.
- MURRIN, L.C.; COYLE, J.T.; KUCHAR, M.J. (1980) Striatal opiate receptors: pre- and postsynaptic localization. *Life Sci.* 27: 1175-1183.
- MYER, E.C.; MORRIS, D.L.; BRASE, D.A.; DEWEY, W.L.; ZIMMERMAN, A.W. (1990) Naltrexone therapy of apnea in children with elevated cerebrospinal beta-endorphin. *Ann. Neurol.* 27: 75-80.
- NAKAZAWA, T.; YAMANISHI, Y.; KANEKO, T. (1991) A comparative study of monoaminergic involvement in the antinociceptive action of E-2078, morphine and U-50,488E. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257 (2) 748-753.
- NANCE, D.M.; BROMLEY, B.; BARNARD, R.J.; GORSKI, R.A. (1977) Sexually dimorphic effects of forced exercise on food intake and body weight in the rat. *Physiol. Behav.* 19: 155-158.

- NANCE, P.W.; SAWYNOK, J.; NANCE, D.M. (1987) Modality specific analgesia produced by intrathecal antisubstance P antibody. En *Substance P and neurokinins*, págs. 282-284. (Editado por Henry J.L., Couture R., Cuello, A.C., Pelletier, G., Quirion R., Regoli D.), *Springer-Verlag*, Berlin, Heidelberg, Nueva York.
- NARANJO, J.R.; SÁNCHEZ-FRANCO, F.; GARZÓN, J.; DEL RIO, J. (1982) Analgesic activity of substance P in rats: apparent mediation by met-enkephalin release. *Life Sci.* 30: 441-446.
- NAUDE, R.J.; OELOFSEN, W.; MASKE, R. (1980) Isolation, characterization and opiate activity of beta-endorphin from the pituitary gland of the ostrich, *Struthio camelus*. *Biochem. J.* 187 (1) 245-248.
- NAUDE, R.J.; CHUNG, D.; LI, C.H.; OELOFSEN, W. (1981) Beta-endorphin: primary structure of the hormone from the ostrich pituitary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98 (1) 108-114.
- NOISIN, E.L.; THOMAS, W.E. (1988) Ontogeny of dopaminergic function in the rat midbrain tegmentum, corpus striatum and frontal cortex. *Dev. Brain Res.* 41: 241-252.

NOMURA, Y.; NAITOH, F.; SEGAWA, T. (1976) Regional changes in monoamine content and uptake of the rat brain during postnatal development. *Brain Res.* 101: 305-315.

NORUŠIS, M.J. (1986) SPSS/PC+ for the IBM PC/XT/AT. *SPSS Inc.*, Chicago (EE.UU.). 404 págs.

OHNO, H.; KURAISHI, Y.; MINAMI, M.; SATOH, M. (1988) Modality-specific antinociception produced by intrathecal injection of anti-somatostatin antiserum in rats. *Brain Res.* 474: 197-200.

ORTEGA-CORONA, B.G.; ESPARZA-AVALOS, N.; SOSA, A. (1979) Sex differences in hypothalamic monoamine levels of the neonatal rat. En *Catecholamines: Basic & Clinical Frontiers* 1: 812-814. (Editado por Usdin E., Kopin I.J., Barchas J.) *Pergamon Press*, Nueva York (EE.UU.)

PAALZOW, G.; PAALZOW, L. (1975) Morphine-induced inhibition of different pain responses in relation to the regional turnover of rat brain noradrenaline and dopamine. *Psychopharmacology* 45: 9-20.

PANCHERI, P.; BRESSA, G.M. (1990) Ansia e dolore. *WYETH*, Aprilia (Italia).

PANKSEPP, J. (1980) Brief social isolation, pain responsivity, and morphine analgesia in young rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 72: 111-112.

PANKSEPP, J.; BISHOP, P. (1981) An autoradiographic map of [<sup>3</sup>H] diprenorphine binding in rat brain: effects of social interactions. *Brain. Res. Bull* 7: 405-410.

PANKSEPP, J.; HERMAN, J.B.; VILBERG, T.; BISHOP, P.; DE ESKINAZI F.G. (1978) Endogenous opioids and social behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 4: 131-134.

PARÉS-HERBUTÉ, N.; TAPIA-ARANCIBIA, L.; ASTIER, H. (1989) Ontogeny of the metencephalic, mesencephalic and diencephalic content of catecholamines as measured by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Int. J. Devl. Neuroscience* 7 (1) 73-79.

PASTERNAK, G.W.; WOOD, P.J. (1986) Minireview: multiple opiate receptors. *Life Sci.* 38: 1889-1898.

PASTERNAK, G.W.; GOODMAN, R.; SNYDER, S.H. (1975) An endogenous morphine-like factor in mammalian brain. *Life Sci.* 16: 1765-1769.

PASTERNAK, G.W.; CHILDERS, S.R.; SNYDER S.H. (1980) Opiate analgesia: evidence for mediation by a subpopulation of opiate receptors. *Science* 208: 514-516.

PATERSON, S.J.; ROBSON, L.E.; KOSTERLITZ, H.W. (1984) Opioid receptors. En *The peptides* 6: 147-189. (Editado por Udenfriend S. y Meienhofer S.), *Academic Press*, Londres (Reino Unido).

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. (1985) Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 14: 149-167.

PERT, C.B.; SNYDER, S.H. (1973) Opiate receptors: its demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014.

PETERS, D.A.V. (1986) Prenatal stress: effect on development of rat brain serotonergic neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1377-1382.

PETRILLO, P.; TAVANI, A.; VEROTTA, D.; ROBSON, L.E; KOSTERLITZ, H.W. (1987) Differential postnatal development of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -opioid binding sites in rat brain. *Dev. Brain Res.* 31: 53-58.

PIERCEY, M.F.; SCHOERDER, L.A. (1980) A quantitative analgesic assay in the rabbit based on the response to tooth pulp stimulation. *Arch. Intl. Pharmacodyn.* 248: 294-304.

POLLARD, H.; LLORENS-CORTES, C.; SCHWARTZ, J.C. (1977) Enkephalin receptors on dopaminergic neurones in rat striatum, *Nature (Lond.)* 268: 745-747.

PORCHER, W.; HELLER, A. (1972) Regional development of catecholamine biosynthesis in rat brain. *J. Neurochem.* 19: 1917-1930.

PORRECA, F.; MOSBERG, H.I.; HURST, R.; HRUBY, V.J.; BURKS, T.F. (1984) Roles of mu, delta, and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230: 341-348.

PORRECA, F.; HEYMAN, J.S.; MOSBERG, H.I.; OMNAAS, J.R.; VAUGHT, J. (1987) Role of mu and delta receptors in the supraspinal and spinal analgesic effects of D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>) enkephalin in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 383-400.

PRICE, E.O.; HUCK, U.W. (1976) Open-field behavior of wild and domestic Norway rats. *Anim. Learn. Behav.* 4 (2) 125-130.

PUGLISI-ALLEGRA, S.; OLIVERIO, A. (1983) Social isolation: effects on pain threshold and stress-induced analgesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19: 679-681.

PUGLISI-ALLEGRA, S.; CASTELLANO, C.; FILIBECK, U.; OLIVERIO, A.;

- MELCHIORRI, P. (1982) Behavioural data on dermorphins in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 82: 223-227.
- PUJOL A., DE CABO, C., MARTÍN, M.I., VIVEROS, M.P. (1993) A developmental study on stress-induced-antinociception as measured by the tail electric stimulation test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (en prensa).
- RANDALL, L.D.; SELLITO, J.J. (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 111: 409-417.
- RANDALL, P.K.; CAMPBELL, B.A. (1976) Ontogeny of behavioral arousal in rats: effect of maternal and sibling presence. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 90 (5) 453-459.
- RBI Catalog/Handbook (1992-93). Neurochemicals for the neuroscientist. *Research Biochemicals Incorporated*, Natick (EE.UU.), 274 págs.
- REID, I.A. (1992) Polypeptides. En *Basic & Clinical Pharmacology*, capítulo 17, págs. 250-262. (Editado por Katzung B.G.), *Appleton & Lange*, East Norwalk (EE.UU.), 1017 págs.
- REID, M.; HERRERA-MARSCHITZ M.; HÖKFELT T.; TERENIUS, L.; UNGERSTEDT, U. (1988) Differential modulation of striatal dopamine release by intranigral

injection of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), dynorphin A and substance P. *Eur. J. Pharmacol.* 147: 411-420.

REYNOLDS, D.V. (1969) Surgery in the rat during electrical analgesia induced by local brain stimulation. *Science* 164: 444-445.

RICHMOND, G.; SACHS, B.D. (1984) Maternal discrimination of pup sex in rats. *Dev. Psychobiol.* 17: 87-89.

RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; CEBEIRA, M.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J.J.; NAVARRO, M.; RAMOS, J.A. (1991) Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience* 43 (2/3) 713-723.

RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.; HERNÁNDEZ, M.L.; DE MIGUEL, R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J.J.; RAMOS, J.A. (1992) Early changes in the development of dopaminergic neurotransmission after maternal exposure to cannabinoids. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41: 469-474.

ROFFLER-TARLOV, S.; SHARMAN, D.F.; TERGERDINE, P. (1971) 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid in the mouse striatum: a reflection of intra- and extraneuronal metabolism of dopamine? *Br. J. Pharmacol.* 42: 343-351.



- ROMERO, M-T; BODNAR, R.J. (1986) Gender differences in two forms of cold-water swim analgesia. *Physiol. Behav.* 37: 893-897.
- ROSECRANS, J.A.; ELCHISAK, M.A.; HARRY, G.J. (1977) Morphine and methadone-induced antinociception in rats permanently depleted of brain dopamine. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 229: 287-300.
- ROTH, B.L.; GALLOWAY, M.P.; COSCIA, C.J. (1980) The effects of morphine on catecholamine metabolism during postnatal development. *Brain Res.* 197: 561-564.
- ROTHMAN, R.B.; McLEAN, S.; BYKOV, V.; LESSOR, R.A.; JACOBSON, A.E.; RICE, K.C.; HOLADAY, J.W. (1987) Chronic morphine up-regulates a mu-opiate binding site labeled by <sup>3</sup>H-cycloFOXY: a novel opiate antagonist suitable for positron emission tomography. *Eur. J. Pharmacol.* 142: 73-81.
- ROTHMAN, R.B.; LONG, J.B.; BYKOV, V.; JACOBSON, A.E.; RICE, K.C.; HOLADAY, J.W. (1988) Beta-FNA binds irreversibly to the opiate receptor complex: in vivo and in vitro evidence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247 (2) 405-416.
- ROTHMAN, R.B.; LONG, J.B.; BYKOV, V.; JACOBSON, A.E.; RICE, K.C.; HOLADAY, J.W. (1990) Pretreatment of rats with the irreversible mu-receptor antagonist, beta-FNA, fails to prevent naltrexone-induced upregulation of mu-opioid

receptor. *Neuropharmacology* 29 (9) 805-810.

RYAN, S.M.; ARNOLD, A.P.; ELDE, R.P. (1981) Enkephalin-like immunoreactivity in vocal control regions of the zebra finch brain. *Brain. Res.* 229 (1) 236-240.

SAMANIN, R.; GUMULKA, W.; VALZELLI, L. (1970) Reduced effect of morphine in midbrain raphe lesioned rats. *Eur. J. Pharmacol.* 10: 339-343.

SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P.; GARZÓN, J. (1989) Evaluation of  $\delta$  receptor mediation of supraspinal opioid analgesia by in vivo protection against the  $\beta$ -funaltrexamine antagonist effect. *Eur. J. Pharmacol.* 159: 9-13.

SAÑUDO, M.C. (1990) Antiandrógenos, período crítico perinatal y diferenciación sexual del cerebro en la rata. *Tesis de Licenciatura*. Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal), Facultad de Biología, U.C.M., Madrid, 126 págs.

SATOH, M.; KURAISHI, Y. (1991) Opioid interactions with other neuropeptides in the spinal cord: relevance to nociception. En *Neurobiology of Opioids*, capítulo 16, págs. 261-271. (Editado por Almeida O.F.X. y Shippenberg T.S.), *Springer-Verlag*. Berlín Heidelberg Nueva York, 456 págs.

SCHMIDT, C.; XIE, J.; FOURNIE-ZALUSKI, M.C.; PEYROUX, J.; ROQUES, B.P.

(1989) Antinociception and endogenous enkephalins. *Advan. Biosci.* 75: 475-478.

SCHNEIDER, W.C. (1957) Methods in enzymology. *Colowick & Kaplan*, Nueva York.

SCHOFFELMEER, A.N.; RICE, K.C.; HEIJNA, M.H.; GOGENBOOM, F.; MULDER,

A.H. (1988) Fentanyl isothiocyanate reveals the lack of existence of physically associated mu- and delta-opioid receptors mediating inhibition of adenylate cyclase in rat neostriatum. *Eur. J. Pharmacol.* 140: 179-182.

SCHULZ, R.; FAASE, E.; WÜSTER, M.; HERZ, A. (1979) Selective receptors for beta-endorphin on the rat vas deferens. *Life Sci.* 24: 843-850.

SEGARRA, A.C.; McEWEN, B.S. (1992) Drug effects on sexual differentiation of the brain: role of stress and hormones in drug actions. En *Maternal substance abuse and the developing nervous system*, capítulo 13, págs. 323-367. (Editado por Zagon I.S. y Slotkin T.A.), *Accademic Press, Inc*, San Diego (EE.UU.), 377 págs.

SEWELL, R.D.E. (1980) Naloxone antagonism of suckling behaviour in newborn rats suggests a possible endorphin modulation. *IRCS Med. Sci. Biochem. Dev. Biol. Med. Metabol. Nutr. Nerv. Sys. Pharmacol. Psychol. Psychiat. Rep. Obs. Gynecol.* 8: 224.

- SHARMA, T.R.; CHAN, W.C.; GINTZLER, A.R. (1988) Effect of chronic naltrexone administration and its withdrawal on the regional activity of neurons that contain norepinephrine, dopamine and serotonin. *Brain Res.* 442: 379-386.
- SHARPE, R.M. (1975) The influence of the sex of litter mates on subsequent maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. *Animal Behaviour* 23 (3) 551-559.
- SHOOK, J.E.; KAMIERSKI, W.; WIRE, W.S.; LEMCKE, P.K.; HRUBY, V.J.; BURKS, T.F. (1988) Opioid receptor selectivity of  $\beta$ -endorphin in vitro and in vivo mu, delta and epsilon receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246 (3) 1018-1025.
- SIDDIQUI, A.; GILMORE, D.P.; CLARK, J. (1989) Regional differences in the indoleamine content of the rat brain: effects of neonatal castration and androgenization. *Biogenic Amines* 6 (1) 105-114.
- SIEGEL, M.A.; JENSEN, R.A. (1986) The effects of naloxone and cage size on social play and activity in isolated young rats. *Behav. Neural Biol.* 45: 155-168.
- SILVESTRI, M.; PAGA, C. (1991) Stress and eating behavior. En *Stress and related disorders: from adaptation to dysfunction*, capítulo 13, págs. 109-112. (Editado por Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F., Martignoni E.). *The Parthenon Publishing Group*, Lancs, Nueva Jersey (Reino Unido, EE.UU.), 486 págs.

- SIMERLY, R.B.; SWANSON, L.P.; GORSKI, R.A. (1984) Demonstration of a sexual dimorphism in the distribution of serotonin-immunoreactive fibers in the medial preoptic nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 225: 151-166.
- SIMON, E.J.; HILLER, J.M.; EDELMAN, I. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic <sup>3</sup>H etorphine to rat-brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1947-1949.
- SIRINATHSINGHJI, D.J.S.; MOTTA, M.; MARTINI, L. (1985) Induction of precocious puberty in the female rat after chronic naloxone administration during the neonatal period: the opiate "brake" on prepubertal gonadotropin secretion. *J. Endocr.* 104: 299-307.
- SLOB, A.K.; BOGERS, H.; VAN STOLK, M.A. (1981) Effects of gonadectomy and exogenous gonadal steroids on sex differences in open field behaviour of adult rats. *Behav. Brain Res.* 2: 347-362.
- SLOB, A.K.; HUIZER, T.; VAN DER WERFF TEN BOSCH, J.J. (1986) Ontogeny of sex differences in open-field ambulation in the rat. *Physiol. Behav.* 37: 313-315.
- SMITH, C.U.M. (1989) Elements of molecular neurobiology. *John Wiley & Sons*, Chichester, Nueva York, Brisbane, Toronto, Singapur.

- SMITH, G.J.; SPEAR, N.E. (1978) Effects of the home environment on withholding behaviors and conditioning in infant and neonatal rats. *Science* 202: 327-329.
- SMOTHERMAN, W.P. (1983) Mother-infant interaction and the modulation of pituitary-adrenal activity in rat pups after early stimulation. *Dev. Psychobiol.* 16 (3) 169-176.
- SPAIN, J.W.; ROTH, B.L.; COSCIA, C.J. (1985) Differential ontogeny of multiple opioid receptors ( $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$ ). *J. Neurosci.* 5 (3) 584-588.
- SPEAR, L.P.; SCALZO, F.M. (1985) Ontogenetic alterations in the effects of food and/or maternal deprivation on 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratios. *Dev. Brain Res.* 18: 143-157.
- SPEAR, L.P.; ENTERS, E.K.; ASWALD, M.A.; LOUZAN, M. (1985) Drug and environmentally induced manipulations of the opiate and serotonergic systems alter nociception in neonatal rat pups. *Behav. Neural Biol.* 44: 1-22.
- STANTON, M.E.; GUTIERREZ, Y.R.; LEVINE, S. (1988) Maternal deprivation potentiates pituitary-adrenal stress responses in infant rats. *Behav. Neurosci.* 102 (5) 629-700.

STEECE, K.A.; DELEON-JONES, F.A.; LEE, J.M.; RITZMANN, R.F. (1986) The effect of chronic met-enk on various dopamine systems in the rat. *Progress in Opioid Research Proceedings of the 1986 International Narcotics Research Conference. NIDA Research Monograph 75*: 583-586.

STEENBERGEN, H.L.; FARABOLLINI, F.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN DE POLL, N.E. (1991) Sex-dependent effects of aversive stimulation on hole board and elevated plus-maze behavior. *Behav. Brain Res.* 43: 159-165.

STEIN, C. (1991) Opioid analgesia at peripheral sites. En *Neurobiology of Opioids*, capítulo 17, págs. 273-285. (Editado por Almeida O.F.X. y Shippenberg T.S.), Springer-Verlag. Berlín Heidelberg Nueva York, 456 págs.

STEIN, C.; MILLAN, M.J.; SHIPPENBEG, T.S.; PETER, K.; HERZ, A. (1989) Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248: 1269-1275.

STEIN, C.; GRAMSCH, C.; HERZ, A. (1990) Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation. Local opioid receptors and  $\beta$ -endorphin. *J. Neurosci.* 10: 1292-1298.

STEWART, J.; SKVARENINA, A.; POTTIER, J. (1975) Effects of neonatal androgens on open-field and maze learning in the prepubescent and adult rat. *Physiol. Behav.* 14: 291-295.

STONE, E.A. (1978) Possible grooming deficit in stressed rats. *Res. Com. Psychol. Psychiat. Behav.* 3 (2) 109-115.

STUDELSKA, D.R.; BEATTY, W.W. (1978) Open-field and avoidance behavior after neostriatal lesions in male and female rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92 (2) 297-311.

SUNAL, R. (1986) Influence of naloxone on H<sub>2</sub>-receptor blocker drugs effects in the "behavioral despair" test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25: 511-513.

SZETO, H.H.; CHENG P.Y. (1992) Effects of opiates on the physiology of the fetal nervous system. En *Maternal substance abuse and the developing nervous system*, capítulo 10, págs. 215-240. (Editado por Zagon I.S. y Slotkin T.A), *Accademic Press, Inc*, San Diego (EE.UU.), 377 págs.

TAKEMORI, A.E.; LARSON, D.L.; PORTOGHESE, P.S. (1981) The irreversible narcotic antagonistic and reversible agonistic properties of the fumarate methyl ester derivative of naltrexone. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 445-451.



- TAN, D-P; TSOU K. (1988) Intranigral injection of dynorphin in combination with substance P on striatal dopamine metabolism in the rat. *Brain Res.* 443: 310-314.
- TANG, H.; COLLINS, R. J. (1978) Enhanced analgesic effects of morphine after chronic administration of naloxone. *Eur. J. Pharmacol.* 47: 473-474.
- TAZI, A.; DANTZER, R.; MORMÈDE, P.; LE MOAL, M. (1985) Effects of naloxone,  $\beta$ -endorphin and ACTH on acquisition of schedule-induced polydipsia. *Psychopharmacology* 85: 87-91.
- TAZI, A.; DANTZER, R.; MORMÈDE, P.; LE MOAL, M. (1986) Pituitary-adrenal correlates of schedule-induced polydipsia and wheel running in rats. *Behav. Brain Res.* 19: 249-256.
- TAZI, A.; DANTZER, R.; LE MOAL, M. (1987) Prediction and control of food rewards modulate endogenous pain inhibitory systems. *Behav. Brain Res.* 23: 197-204.
- TEMPEL, A.; ZUKIN, R.S.; GARDNER, L. (1982) Supersensitivity of brain opiate receptor subtypes after chronic naltrexone treatment. *Life Sci.* 31: 1401-1404.
- TEMPEL, A.; GARDNER, E. L.; ZUKIN, R. S. (1984) Visualization of opiate receptor upregulation by light microscopy autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:

3893-3897.

TEMPEL, A.; HABAS, J-E; PAREDES, W.; BARR, G.A. (1988) Morphine-induced downregulation of  $\mu$ -opioid receptors in neonatal rat brain. *Dev. Brain. Res.* 41: 129-133.

TERENIUS, L. (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesic and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 32: 317-320.

TERENIUS, L.; WAHLSTROM, A. (1975) Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. *Acta Physiol. Scand.* 94: 74-81.

TERMAN, G.W.; LEWIS, J.W.; LIEBESKIND, J.C. (1986) Two opioid forms of stress analgesia studies of tolerance and cross-tolerance. *Brain Res.* 368: 101-106.

TRENTINI, G.P.; GENNAZZANI, A.R.; DE GAETANI, C.; PETRAGLIA, F., CRISCUOLO, M.; FICARRA, G.; BIDZINSKA, B. (1991) The circadian rhythm in hypothalamic  $\beta$ -endorphin content: its putative role in daily changes in stress response. En *Stress and related disorders: from adaptation to dysfunction*, capítulo 14, págs. 113-120. (Editado por Genazzani A.R., Nappi G., Petraglia F., Martignoni E.). *The Parthenon Publishing Group*, Lancs, Nueva Jersey (Reino Unido, EE.UU.),

486 págs.

TSANG, D.; NG, S.C. (1980) Effect of antenatal exposure to opiates on the development of opiate receptors in rat brain. *Brain. Res.* 188: 199-206.

TSANG, D.; NG, S.C.; HO, K.P.; (1982a) Development of methionine-enkephalin and naloxone binding sites in regions of rat brain. *Dev. Brain. Res.* 3: 637-644.

TSANG, D.; NG, S.C.; HO, K.P.; HO, W.K.K. (1982b) Ontogenesis of opiate binding sites and radioimmunoassayable  $\beta$ -endorphin and enkephalin in regions of rat brain. *Dev. Brain. Res.* 5: 257-261.

TSOU, K.; JANG, C.S. (1964) Studies on the site of analgesia action of morphine by intracerebral microinjection. *Sci. Sin.* 7: 1099.

TUOMISTO, J.; MANNISTO, P. (1985) Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol. Rev.* 37: 249-331.

TURNER, R.A. (1965) Analgesics. En *Screening methods in Pharmacology*, págs. 100-117. Academic Press, Nueva York (EE.UU.).

- TYERS, M.B. (1980) A classification of opiate receptors that mediate antinociception in animals. *Br. J. Pharmacol.* 69: 503-512.
- TYERS, M.B. (1982) Studies on the antinociceptive activities of mixtures of  $\mu$ - and  $\kappa$ -opiate receptor agonists and antagonists. *Life Sci.* 31: 1233-1236.
- UDENFRIEND, S.; KILPATRICK, L. (1984) Proenkephalin and the products of its processing: chemistry and biology. En *The peptides* 6: 26-28. (Editado por Udenfriend S. y Meienhofer S.), *Academic Press*, Londres (Reino Unido).
- UKAI, M.; HOLTZMAN, S.G. (1988) Effects of beta-funaltrexamine on ingestive behaviors in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 153: 161-165.
- VALLE, F.P.; BOLS, R.J. (1976) Age factors in sex differences in open-field activity of rats. *Anim. Learn. Behav.* 4 (4) 457-460.
- VAN ABEELLEN, J.H.F. (1989) Genetic control of hippocampal cholinergic and dynorphinergic mechanisms regulating novelty-induced exploratory behavior in house mice. *Experientia* 45: 839-845.
- VAN DE POLL, N.E.; VAN DER ZWAN, S.M.; VAN OYEN, H.G.; PATER J.H. (1982) Sexual behavior in female rats born in all-female litters. *Behav. Brain Res.* 4:103-

109.

VÁZQUEZ, D.M.; AKIL, H. (1992) Development of pituitary pro-opioimelanocortin gene and peptide expression: characterization and effect of repeated intermittent maternal isolation. *Neuroendocrinology* 56: 320-330.

VERTES, Z.G.; MELEGH, M.; VERTES, M.; KOVACS, S. (1982) Effect of naloxone and D-met<sup>2</sup>-pro<sup>5</sup>-enkephalinamide treatment on the DNA synthesis in the developing rat brain. *Life Sci.* 31: 119-126.

VIDAL, C.; JACOB, J. (1985) Hyperalgesia induced by emotional stress in the rat. An experimental animal model of human anxiogenic hyperalgesia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 467: 104-115.

VILLESCAS, R.; BELL, R.W.; WRIGHT, L.; KUFNER, M. (1977) Effect of handling on maternal behavior following return of pups to the nest. *Dev. Psychobiol.* 10 (4) 323-329.

VIVEROS, M.P. (1985) Estudio del síndrome general de adaptación inducido por las condiciones de población en la rata: modelo comportamental asociado. *Tesis Doctoral*. Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal), Facultad de Biología, U.C.M., Madrid, 284 págs.

VIVEROS, M.P., PUJOL A., DE CABO, C., MARTÍN, M.I. (1993) A study on the development of nociceptive responses in pre- and postweanling rats: the tail electric stimulation test as a suitable methodology. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 15 (1) (en prensa).

VIVEROS, P.M.; HERNÁNDEZ, R.; MARTÍNEZ, I.; GONZÁLEZ, P. (1988) Effects of social isolation and crowding upon adrenocortical reactivity and behavior in the rat. *Rev. Esp. Fisiol.* 44 (3) 315-322.

VOGT, J.L.; HENNESSY, M.B.; LEVINE, S. (1983) Effects of social experience on the corticosterone response of adult rats to pup cues. *Dev. Psychobiol.* 17 (2) 151-159.

VOLTERRA, A.; BRUNELLO, N.; RESTANI, P.; GALLI, C.L.; RACAGNI, G. (1986) Ontogenetic studies on mu, delta and kappa opioid receptors in rat brain. *Pharmacol. Res. Comm.* 18 (10) 979-990.

WALKER, J.M.; THOMPSON, L.A.; FRASCELLA, J.; FRIEDERICH, M.W. (1987) Opposite effects of  $\mu$  and  $\kappa$  opiates on the firing-rate of dopamine cells in the substantia nigra of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 134: 53-59.

WARD, S.J.; PORTOGHESE, P.S.; TAKEMORI, A.E. (1982a) Improved assays for the assessment of  $\kappa$  and  $\delta$ -properties of opioid ligands. *Eur. J. Pharmacol.* 85: 163-170.

WARD, S.J.; PORTOGHESE, P.S.; TAKEMORI, A.E. (1982b) Pharmacological characterisation in vivo of the novel opiate,  $\beta$ -funaltrexamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220: 494-498.

WARD, S.J.; FRIES, D.S.; LARSON, D.L.; PORTOGHESE, P.S.; TAKEMORI, A.E. (1985) Opioid receptor binding characteristics of the non-equilibrium  $\mu$  antagonist,  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA). *Eur. J. Pharmacol.* 107: 323-330.

WATSON, S.J.; AKIL, H.; KHACHATURIAN, H.; YOUNG, E.; LEWIS, M.E. (1984) Opioid systems: anatomical, physiological and clinical perspectives. En *Opioids: past, present and future*, págs. 145-178. (Editado por Hughes J., Collier H.O.J. y Rance M.J.), *Taylor & Francis*, Londres (Reino Unido).

WATTS, A.G.; STANLEY H.F. (1984) Indoleamines in the hypothalamus and area of the midbrain raphe nuclei of male and female rats throughout postnatal development. *Neuroendocrinology* 38: 461-466.

WAY, W.L.; WAY, E.L. (1992) Opioid analgesics & antagonists. En *Basic & Clinical Pharmacology*, capítulo 30, págs. 420-436. (Editado por Katzung B.G.), *Appleton & Lange*, East Norwalk (EE.UU.), 1017 págs.

WESTERINK, B.H.C. (1985) Sequence and significance of dopamine metabolism in the

rat brain. *Neurochem. Int.* 7 (2) 221-227.

WIER, P.J.; GUERRIERO, F.J.; WALKER, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fund. App. Toxicol.* 13: 118-136.

WIESENFELD-HALLIN, Z.; XU, X-J (1992) The effects of opioid and neuropeptides on spinal nociceptive mechanisms. En *Animal Pain*, capítulo 6, págs. 121-132. (Editado por Short C.E. y Van Poznak A.), *Churchill Livingstone Inc.*, Nueva York, Edimburgo, Londres, Melbourne, Tokio, 587 págs.

WIESNER, J.B.; DUDLEY, C.A.; MOSS, R.L. (1986) Effect of  $\beta$ -endorphin on sociosexual proclivity in a choice paradigm. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 507-511.

WILKES, M.M.; YEN, S.S.C. (1980) Reduction by  $\beta$ -endorphin of the efflux of dopamine and DOPAC from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci.* 27: 1387-1391.

WILKINSON, L.O.; DOURISH, C.T. (1991) Serotonin and animal behaviour. *Serotonin Receptor Subtypes: Basic and Clinical Aspects*, capítulo 7, págs. 147-210. *Wiley-Liss, Inc.* (Reino Unido).

WILSON, W.E.; AGRAWAL, A.K. (1979) Brain regional levels of neurotransmitter



amines as neurochemical correlates of sex-specific ontogenesis in the rat. *Dev. Neurosci.* 2: 195-200.

WILSON, C.A.; PEARSON, J.R.; HUNTER, A.J.; TUOHY, P.A.; PAYNE, A.P. (1986)

The effect of neonatal manipulation of hypothalamic serotonin levels on sexual activity in the adult rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1175-1183.

WILSON, C.A.; GONZÁLEZ, I.; FARABOLLINI, F. (1991) Behavioral effects in

adulthood of neonatal manipulation of brain serotonin levels in normal and androgenized females. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41: 91-98.

WILLIAMS, F.G.; BEITZ, A.J. (1990) Ultrastructural morphometric analysis of GABA-

immunoreactive terminal in the ventrocaudal periaqueductal grey: analysis of the relationships of GABA A receptor to periaqueductal grey-raphe magnus projection neurons. *J. Neurocytol.* 19: 686.

WINSLOW, J.T.; INSEL, T.R. (1991) Endogenous opioids: do they modulate the rat pup's

response to social isolation? *Behav. Neurosci.* 105 (2) 253-263.

WOOD, A. (1855) New method of treating neuralgia by the direct application of opiates

to the painful points. *Edinburg Med. Surg. J.* 82: 265-281.

YAKSH, T.L.; TYCE, G.M. (1979) Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from the spinal cord. *Brain Res.* 171: 176-181.

YAKSH, T.L.; NONEIHED, R. (1985) The physiology and pharmacology of spinal opiates. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 433-462.

YEADON, M.; KITCHEN, I. (1988) Comparative binding of  $\mu$  and  $\delta$  selective ligands in whole brain and pons/medulla homogenates from rat: affinity profiles of fentanyl derivatives. *Neuropharmacol.* 27: 345-348.

ZADINA, J.E.; KASTIN, A.J.; COY, D.H.; ADINOFF, B.A. (1985) Developmental, Behavioral, and opiate receptor changes after prenatal or postnatal  $\beta$ -endorphin, CRF, or Tyr-MIF-1. *Psychoneuroendocrinology* 10: 367-383.

ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J. (1979) Morphological identification and biochemical characterization of isolated brain cell nuclei from the developing rat cerebellum. *Brain Res.* 170: 443-457.

ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J. (1984) Naltrexone modulates body and brain development in rats: a role for endogenous opioid systems in growth. *Life Sci.* 35: 2057-2064

ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J. (1986a)  $\beta$ -Funaltrexamine ( $\beta$ -FNA) and the regulation of body and brain development in rats. *Brain. Res. Bull.* 17: 5-9.

ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J. (1986b) Opioid antagonist (naltrexone) modulation of cerebellar development: histological and morphometric studies. *J. Neurosci.* 6 (5) 1424-1432.

ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J. (1987) Endogenous opioid systems regulate cell proliferation in the developing rat brain. *Brain Res.* 412: 68-72.

ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J. (1990a) Drugs of abuse and the fetus and neonate: testing and evaluation in animals. En *Modern Methods in Pharmacology* 6: 241-254.

ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J. (1990b) Ultrastructural localization of enkephalinlike immunoreactivity in developing in developing rat cerebellum. *Neuroscience* 34: 479-489.

ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J. (1991) Identification of opioid peptides regulating proliferation of neurons and glia in the developing nervous system. *Brain. Res.* 542: 318-323.

- ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J. (1992) Maternal exposure to opioids and the developing nervous system: laboratory findings. En *Maternal substance abuse and the developing nervous system*, capítulo 11, págs. 241-282. (Editado por Zagon I.S. y Slotkin T.A), *Accademic Press, Inc*, San Diego (EE.UU.), 377 págs.
- ZAGON, I.S.; McLAUGHLIN, P.J.; THOMPSON, C.I. (1979) Development of motor activity in young rats following perinatal methadone exposure. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10: 743-749.
- ZAGON, I.S.; GIBO, D.M.; McLAUGHLIN, P.J. (1990) Adult and developing human cerebella exhibit different profiles of opioid-binding sites. *Brain Res.* 523: 62-68.
- ZAGON, I.S.; GIBO, D.M.; McLAUGHLIN, P.J. (1991) Zeta ( $\zeta$ ), a growth-related opioid receptor in developing rat cerebellum: identification and characterization. *Brain Res.* 551: 28-35.
- ZAKARIAN, S.; SMYTH, D. (1982) Review article: Distribution of beta-endorphin related peptides in rat pituitary and brain. *Biochem. J.* 202: 561-571.
- ZUKIN, R.S.; EGHBALI, M.; OLIVE, D.; UNTERWALD, E.M.; TEMPEL, A. (1988) Characterization and visualization of rat and guinea pig brain  $\kappa$ -opioid receptors: evidence for  $\kappa_1$  y  $\kappa_2$  opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4061.